

MESTRADO EM CIÊNCIAS FORENSES  
ESPECIALIZAÇÃO EM MEDICINA LEGAL

# Análise palinológica forense em tecidos de voluntários humanos

Joana Soraia Pereira

M  
2017



Joana Soraia Pereira. Análise palinológica forense em tecidos de voluntários humanos



M.FMUP 2017

Análise palinológica forense em tecidos de voluntários humanos

Joana Soraia Rosas Pereira

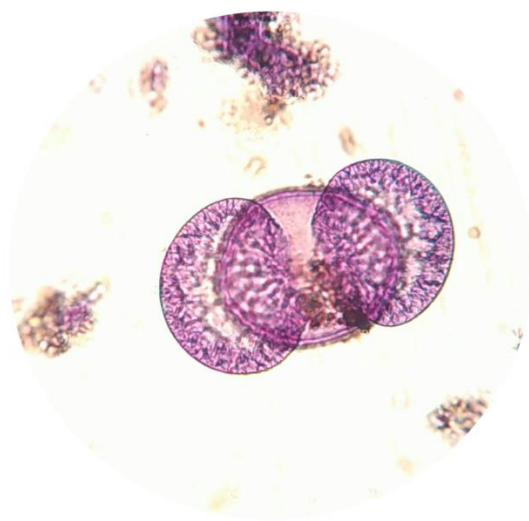
SEDE ADMINISTRATIVA

FACULDADE DE MEDICINA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
FACULDADE DE DIREITO  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA  
FACULDADE DE PSICOLOGIA E DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR



Joana Soraia Rosas Pereira

## **Análise Palinológica Forense em Tecidos de Voluntários Humanos**



*Mestrado em Ciências Forenses*  
*Faculdade de Medicina da Universidade do Porto*

### **Orientador**

Professora Doutora Ilda da Conceição Abreu de Noronha (Faculdade de Ciências da Universidade do Porto)

### **Co-orientadores**

Doutora Helena Isabel Costa Ribeiro (Instituto de Ciências da Terra, Polo Porto)  
Professor Doutor Agostinho José Carvalho Santos (Faculdade de Medicina da Universidade do Porto)

**Porto, 2017**

# Agradecimentos

*O sucesso apenas é possível quando a oportunidade, o empenho e a sorte se encontram.*

A realização desta dissertação não seria possível sem a colaboração e contribuição de várias pessoas, e por esse motivo gostaria de expressar algumas palavras de agradecimento e gratidão.

Em primeiro lugar demonstrar a minha sincera gratidão e agradecimento à Prof. Dra. Ilda Noronha, minha orientadora, pela sua preciosa orientação, pelo conhecimento transmitido, todo o apoio e dedicação, bem como a discussão de resultados e todos os conselhos que me guiaram nesta dissertação. Quero também agradecer-lhe as oportunidades que me deu e através delas me tornou uma melhor profissional. Por último salientar o seu companheirismo, preocupação e amizade que tornaram esta jornada mais alegre, apesar de todos os obstáculos com que nos fomos deparando.

À Dra. Helena Ribeiro, minha coorientadora, prestar o meu sincero agradecimento pelo seu empenho, apoio e entusiasmo constante desde o primeiro dia deste projeto. Por todo o conhecimento que me transmitiu a nível de trabalho laboratorial, identificação polínica e análise de dados. O seu entusiasmo e alegria foram cruciais para o desenvolvimento e conclusão desta dissertação. A ela e à Prof. Ilda agradeço por me terem recebido no seu local de trabalho e o tornarem um pouquinho meu fazendo-me sentir parte da família que é o laboratório de Palinologia.

Ao Prof. Dr. Agostinho Santos, meu coorientador, agradeço a sua orientação na escolha do tema de trabalho, guiando-me para uma área para mim desconhecida e emergente no âmbito das ciências forenses, área pela qual me apaixonei, aprendendo sempre mais e superando-me a cada momento. Agradecer pela sua exigência e revisão deste trabalho, essenciais para o seu melhoramento.

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio e participação de todos os voluntários que se disponibilizaram para a colheita das amostras. Para eles o meu mais puro e sincero obrigado. A sua pronta disponibilidade para participarem, todos eles foram a “luz ao fundo do túnel” desta dissertação, apenas graças ao seu apoio foi possível a existência de amostras e com elas resultados para apresentar. Não consigo encontrar palavras que descrevam o quão grata lhes estou.

Quero também agradecer à Rita Lamas e à Mafalda Pereira, colegas e amigas, por todas as horas alegremente passadas no laboratório, pela boa disposição e apoio nos momentos bons bem como nos menos bons. Tornaram todo o meu trabalho mais fácil e alegre, para não falar das coisas que aprendi convosco.

Por vezes nas coisas mais improváveis é que está aquilo que precisamos, assim não posso passar sem agradecer ao meu Agrupamento de Escuteiros, em especial aos meus Exploradores, por serem o meu escape, por me alegrarem em todos os momentos e por fazerem de mim uma pessoa melhor.

Ao Vítor, meu namorado, para quem um obrigado apenas não é suficiente, pois apoiou-me e encorajou-me em todos os momentos deste trabalho. Ele esteve sempre ao meu lado, ajudando-me a acreditar em mim e no meu trabalho, mesmo quando pareciam não haver motivos para continuar. Todo o seu apoio emocional, que me fez aguentar de forma perseverante por forma a conseguir atingir os meus objetivos. Obrigada por toda a ternura, carinho e amor, bem como por todos os sorrisos roubados nos momentos de maior cansaço.

Agradeço também à minha avó, que apesar de já não estar presente foi uma grande responsável pela pessoa em que me tornei. Ela que sempre me incentivou e ensinou a perseguir os meus sonhos e a lutar sempre para alcançar os meus objetivos. Usei todos os seus ensinamentos na realização desta dissertação, devendo-lhe também a ela a conclusão da mesma.

Por último, não consigo encontrar palavras para expressar a mais profunda gratidão aos meus pais e irmã, que toda a vida me apoiaram, que trabalharam comigo de modo a ultrapassar as dificuldades, que sofreram com os meus problemas e que celebraram comigo todas as vitórias tal como se fossem suas. Eles que sempre estiveram disponíveis, com palavras de incentivo e confiança, que sempre fizeram tudo para tornar o meu trabalho mais fácil, mesmo quando isso implicava construir uma centrifuga. A minha profunda gratidão pela ajuda, não só nesta dissertação mas em todos os momentos da minha vida.







## Resumo

A palinologia é o ramo da botânica que se dedica ao estudo dos palinomorfos. Esta ciência já se mostrou capaz de fornecer a evidência de contacto entre indivíduos e objetos, indivíduos e locais, e objetos e locais, sendo útil na resolução de processos legais. Uma vez que o perfil polínico permite inferir sobre a composição da flora envolvente de um local, região, área geográfica ou país, é possível identificar a origem de uma amostra.

Nesta dissertação, foi realizado um estudo palinológico em amostras de tecidos biológicos (cavidades nasais, tecido subungueal, e cabelo) e solo presente nos sapatos por forma a avaliar a sua utilidade em contexto forense. A avaliação da eficiência dos diferentes tecidos na captura de conteúdo polínico e a sistematização de métodos de amostragem capazes de serem aplicados, sem entropia, na investigação forense foram também estudados. Nesse contexto, foram recolhidas amostras de 20 voluntários humanos em duas estações do ano distintas: inverno e primavera, num total de 40 indivíduos. Foram ainda amostrados 10 voluntários humanos, no dia 5 de Fevereiro de 2017, que permaneceram durante três dias no mesmo local (Arcos de Valdevez) para avaliação do perfil polínico como ferramenta de reconstrução espacial e temporal. A amostragem dos voluntários foi efetuada recorrendo a lavagens e a esfregaços com zaragatoas dependendo do material amostrado. Posteriormente, foi realizada a análise palinológica na qual foram aplicados vários tratamentos físico-químicos com o objetivo de concentrar o conteúdo polínico presente nas amostras.

Com base nos resultados da análise palinológica foi possível verificar que os diferentes tipos de material amostrado funcionam como armadilha natural de pólen, porém estes possuem eficiências de aprisionamento distintas. Essa variação na eficiência de aprisionamento pode ser influenciada por diversos fatores, como por exemplo a época do ano em que a amostragem foi realizada ou o comprimento do material amostrado, como observado para o cabelo. Foi ainda observado que os diferentes materiais amostrados permitem retirar diferentes informações. As cavidades nasais e cabelo, por exemplo, aprisionam pólen atmosférico dando assim uma informação temporal; as amostras de solo, no entanto, permitem avaliar a flora envolvente, sendo úteis na delimitação de possíveis locais. Assim, o estudo conjunto dos diferentes materiais amostrados aumenta a fiabilidade dos resultados obtidos, contribuindo para a correta utilização da análise palinológica como prova na prática forense. Com a análise de parâmetros quantitativos das amostras, foi ainda observável a viabilidade da aplicação da análise palinológica forense para amostras com pesos na ordem dos 0,01 a 0,05 gramas.

O trabalho efetuado nesta dissertação demonstrou assim a capacidade da utilização da análise palinológica sempre que se verificar necessário nas perícias forenses atuais, uma vez que a colheita de amostras é um processo tecnicamente simples e rápido (4 tecidos aproximadamente 30 minutos) e que os resultados possuem aplicabilidade forense.

**Palavras-chave:** análise palinológica, pólen, ciências forenses

# Abstract

Palynology is the branch of botany which dedicates to the study of palinomorphs. This science has already proved to be capable of providing evidence of contact between individuals and objects, individuals and places, and objects and locals, being useful in solving legal proceedings. Since the pollinic profile allows to infer on the composition of the surrounding flora of each local, region, geographic area, or country, it is possible to identify the origin of the sample.

In this dissertation, a palynological study in samples of biological tissues (nasal cavities, subungual tissue, and hair) and soil from shoes was made in order to assess its importance in forensic context. The evaluation of the efficiency of the different tissues in the trapping of pollinic content and the systematization of the sampling methods to be used in the forensic investigation were also studied. In this context, 20 human individuals were sampled in two distinct seasons: winter and spring, for a total of 40 individuals. Ten human volunteers were also sampled, in February 5th 2017, after staying three days in the same local (Arcos de Valdevez) for the evaluation of the pollinic profile as a tool in the spacial and temporal reconstruction. The sampling was performed by washing's and swabs depending on the sampled material. After that a palynological analysis was made where several physical-chemical treatments were applied in order to concentrate the pollinic content present in the samples.

Based on the results of the palynological analysis it was possible to verify that all the different types of sampled material work as a natural pollinic trap; however, their trapping efficiencies are different. The variation in trapping efficiency may be influenced by several factors, among which are the time of the year in which the sampling was performed and the length of the sampled material, as was observed in the hair. It was still observed that different sampled materials retain different information. Nasal cavities and hair, for instance, trap atmospheric pollen, retaining information regarding the time of the year; the soil samples, however, due to its capacity to store pollinic content, allow the evaluation of the surrounding flora, being helpful in the delimitation of possible locals. Therefore, the study of the different sampled materials increase the viability of the final results, contributing to the correct utilization of palynological analysis for the forensic practice. With the analysis of the sample quantitative parameters, the forensic palynological analysis application viability was also observable for samples with a weight between 0.01 to 0.05 grams.

The work developed in this dissertation has demonstrated the capabilities of palynological analysis for its application in forensic investigation, since the sampling is a fairly quick and easy process (4 tissues in approximately 30 minutes) and the results possess forensic applicability.

**Keywords:** palynological analysis, pollen, forensic sciences



# Conteúdo

<b>Agradecimentos</b>	<b>1</b>
<b>Resumo</b>	<b>5</b>
<b>Abstract</b>	<b>7</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>10</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>11</b>
<b>Lista de Acrónimos</b>	<b>14</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>15</b>
<b>2 Estado da Arte</b>	<b>17</b>
2.1 Palinologia . . . . .	18
2.2 Grãos de Pólen . . . . .	18
2.2.1 Morfologia . . . . .	21
2.2.1.1 Tamanho . . . . .	21
2.2.1.2 Polaridade . . . . .	22
2.2.1.3 Simetria . . . . .	23
2.2.1.4 Forma . . . . .	23
2.2.1.5 Aberturas . . . . .	24
2.2.1.6 Ornamentação da exina . . . . .	24
2.2.2 Métodos de dispersão . . . . .	26
2.3 Aplicações Forenses da Palinologia . . . . .	26
<b>3 Materiais e Métodos</b>	<b>31</b>
3.1 Colheita das Amostras . . . . .	32
3.1.1 Cabelo . . . . .	32
3.1.2 Cavidades Nasais . . . . .	33
3.1.3 Tecido Subungueal . . . . .	35
3.1.4 Solo de Sapatos . . . . .	36
3.2 Tratamento Laboratorial . . . . .	37
3.2.1 Lavados do Cabelo . . . . .	39
3.2.2 Cavidades Nasais . . . . .	40
3.2.3 Tecido Subungueal . . . . .	40

3.2.4	Solo dos Sapatos . . . . .	41
3.3	Análise das Amostras . . . . .	41
3.3.1	Montagem das preparações . . . . .	41
3.3.2	Esporos de Lycopodium . . . . .	43
3.3.3	Contagem e Identificação dos Palinomorfos . . . . .	44
3.4	Análise Estatística . . . . .	44
<b>4</b>	<b>Análise Palinológica Forense</b>	<b>45</b>
4.1	Descrição Palinológica . . . . .	46
4.2	Tecidos Biológicos como Armadilha Natural de Pólen . . . . .	49
4.3	Pólen como Elemento de Identificação do Local e Enquadramento Temporal . . . . .	60
<b>5</b>	<b>Conclusão</b>	<b>64</b>



## Lista de Tabelas

2.1	Materiais onde foi aplicada com sucesso a análise palinológica [2, 12, 14]. . .	18
2.2	Classificação dos grãos de pólen em função do tamanho. . . . .	22
2.3	Classificação dos grãos de pólen pela sua forma, estabelecida através da relação P/E. . . . .	24
4.1	Representação dos tipos polínicos contabilizados para: A - cavidades nasais, B - tecido subungueal, C - solo dos sapatos e D - cabelo, para os diferentes momentos de amostragem (Inverno e Primavera). + Corresponde à observação do tipo polínico, 0 corresponde à não observação. . . . .	47

## Lista de Figuras

2.1	Estame e corte transversal de uma antera. . . . .	19
2.2	Ciclo reprodutor das plantas (angiospérmicas): ciclo haplodiplonte. . . . .	20
2.3	Estrutura da parede celular dos grãos de pólen. . . . .	21
2.4	Polaridade dos grãos de pólen. (a) Representação dos eixos polares numa téttrade de micrósporos. (b) Classificação dos grãos de pólen em função da sua polaridade em isopolares e heteropolares. . . . .	22
2.5	Forma dos grãos de pólen em função da relação entre o eixo polar e o eixo equatorial: (a) oblado (b) esferoidal (c) prolado. . . . .	23
2.6	Classificação das aberturas presentes nos esporos e grãos de pólen, descrita por Erdtman em função do número, posição e localização (classificação NPC) [12]. . . . .	25
2.7	Tipos de ornamentação da exina. . . . .	25
3.1	Imagem demonstrativa da colheita de amostras em cabelos longos (a) e cabelos curtos (b). . . . .	33
3.2	Representação da amostragem das cavidades nasais com recurso a uma zaragatoa, ilustrando a região amostrada (a verde) e a região não amostrada (a vermelho). . . . .	34
3.3	Demonstração da colheita de amostras no tecido subungueal em dois passos: (a) raspagem e (b) lavagem. . . . .	35
3.4	Demonstração da colheita de amostras na sola do calçado em dois passos: (a) raspagem e (b) lavagem. . . . .	36
3.5	Representação esquemática dos tratamentos aplicáveis durante a análise palinológica. . . . .	39
3.6	Processo de destruição das zaragatoas em $H_2SO_4$ . . . . .	40
3.7	Filtração das amostras de solo com recurso a malha de $200\ \mu m$ . . . . .	41
3.8	Processo de secagem do sedimento através da inversão dos tubos e repouso durante um dia. . . . .	42
3.9	Montagem das preparações microscópicas: (a) realização de traços de histolague na lamela e (b) selagem da lamela após conclusão da montagem da preparação. . . . .	43
4.1	Gráfico circular dos tipos polínicos dominantes nos diferentes tipos de material amostrado para: (a) inverno e (b) primavera. . . . .	48
4.2	Distribuição do peso inicial da amostra presente em: (a) cavidades nasais, (b) tecido subungueal, (c) solo presente no calçado e (d) cabelo. . . . .	49

4.3	Concentração total de pólen (nº pólen/grama) em função dos indivíduos amostrados para: (a) tecidos biológicos amostrados no inverno, (b) tecidos biológicos amostrados na primavera, (c) solo presente nos sapatos amostrados no inverno e (d) solo presente nos sapatos amostrados na primavera. . . . .	51
4.4	Evolução temporal da concentração total de pólen (nº pólen/grama) presente em: (a) cavidades nasais, (b) tecido subungueal, (c) solo presente no calçado e (d) cabelo. Ajustes lineares aos dados experimentais são apresentados para cada tipo de tecido. . . . .	52
4.5	Evolução do peso inicial da amostra (g) e da concentração total de pólen (nº pólen/grama) em função do comprimento dos tecidos para: (a, b) comprimento das unhas e (c, d) comprimento do cabelo. . . . .	54
4.6	Fotografia ilustrativa da diferença entre alinhamentos para cabelos curtos e cabelos compridos (a)(b) . . . . .	54
4.7	Peso inicial da amostra (a) e concentração total de pólen (b) nas amostras de solo do calçado em função do tipo de sola. (c) Diferentes tipos de sola amostrados. . . . .	55
4.8	Dendograma da análise de cluster obtido usando as concentrações dos tipos polínicos para os diferentes indivíduos em dois casos distintos: (a) cavidades nasais e (b) tecido subungueal. . . . .	57
4.9	Dendograma da análise de cluster obtido usando as concentrações dos tipos polínicos para os diferentes indivíduos em dois casos distintos: (a) solo e (b) cabelo. . . . .	58
4.10	Dendograma da análise de cluster obtido usando as concentrações dos tipos polínicos para diferentes indivíduos usando os valores de concentração (nº pólen/grama) de amostras de solo. . . . .	59
4.11	Concentração total de pólen (nº pólen/grama) em função dos indivíduos amostrados para: cavidades nasais, tecido subungueal, cabelo e solo. . . . .	60
4.12	Média da frequência (%) dos diferentes tipos polínicos encontrados nas amostras de tecido subungueal, cabelo e solo. Foi também calculado o desvio padrão para cada tipo polínico representado pela barra de erro. . . . .	61
4.13	Dendograma da análise de cluster obtido usando as concentrações dos diferentes indivíduos para os diferentes tipos de material amostrado (com exceção das amostras das cavidades nasais que não apresentavam conteúdo polínico). . . . .	62

# Lista de Acrónimos

C<sub>14</sub> - Carbono 14 (Isótopo Radioativo do Carbono)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

g - Grama

h - Horas

HCl - Ácido clorídrico

HF - Ácido fluorídrico

H<sub>2</sub>O - Água

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Ácido sulfúrico

KOH - Hidróxido de potássio

M - Molar

min - Minutos

mL - Mililitros

rpm - Rotações por minuto

s - Segundos

μl - Microlitro

μm - micrómetro

## Capítulo 1

# Introdução

Atualmente a palinologia tem um forte impacto na sociedade, estando associada a fatores económicos, de bem-estar humano e conhecimento científico. Várias aplicações importantes como o estudo de alergias, elaboração de calendários polínicos, a previsão de colheitas, o estudo do mel (melissopalynologia), estudos evolutivos e taxonómicos, estudos históricos de vegetação, estudos sobre o impacto do Homem na vegetação do passado, aplicações estratigráficas de correlação e datação de depósitos, estudos sobre o aquecimento global e a aplicação forense fazem da palinologia uma ciência versátil e essencial à sociedade.

A palinologia é o ramo da botânica que se dedica ao estudo dos palinórfos e foi inicialmente aplicada por Lennart von Post, em contexto geológico, como ferramenta de datação e correlação de depósitos de carvão [1]. O termo palinologia foi descrito por Hyde e Williams em 1944 e correspondia apenas ao estudo dos grãos de pólen e esporos, porém o termo tornou-se mais amplo com o evoluir da ciência e aumento da sua aplicabilidade. Atualmente a palinologia é descrita como o estudo dos palinórfos, sendo considerados palinórfos todas as estruturas microscópicas resistentes a ácidos, desde esporos fúngicos a quistos de algas, passando pelos grãos de pólen [2, 3]. Dada a sua resistência, os palinórfos tendem a ficar preservados por longos períodos de tempo, mesmo quando expostos a ambientes agressivos.

O principal objetivo das ciências forenses é o estudo de evidências, de variados tipos, relacionadas com atividades criminosas [4]. Dado o número elevado de tipos de evidência, as ciências forenses assentam na multidisciplinaridade e conjugação de várias disciplinas científicas, que após a sua aplicação e interpretação fidedigna podem ser utilizadas em tribunal para auxílio da tomada de decisão. Para que a aplicação das ciências forenses possa ser útil, as questões como Quem? Quando? Como? Onde? Porquê? e O quê? devem ser respondidas.

Desde a fundamentação de Edmond Locard que surgiu em 1930, sobre a transferência de evidências que o seu princípio conhecido como Princípio da Troca se tornou o princípio chave subjacente à investigação forense [4]. Locard defendia que: “Sempre que dois objetos entram em contacto, há sempre uma transferência de material” [5, 6]. Assim ele acreditava que não havia possibilidade de um criminoso não deixar evidências na cena do crime, ou nas vítimas, tendo publicado: “por um lado, o criminoso à sua passagem deixa marcas na cena do crime; por outro lado, e por ação inversa, ele leva consigo no corpo ou na roupa evidências da sua presença ou ação” [5]. Deste modo, a lógica por detrás deste princípio

permite ao investigador estabelecer ligações de suspeitos a vítimas, objetos e locais, e assim responder às questões essenciais da investigação forense.

Dada a diversidade das evidências incluídas nas ciências forenses, estas podem, também, ser palinomorfas. Assim, a palinologia forense é o ramo das ciências forenses que se dedica ao estudo do pólen e esporos como evidências em contexto de investigação criminal. Os grãos de pólen e os restantes palinomorfas pertencem ao grupo das “provas silenciosas”, uma vez que apresentam dimensões tão pequenas que permitem a sua fácil adesão a vários tipos de meios sem serem visualizados [4, 7].

Locard, no seu trabalho de 1930 referia o pólen como sendo um tipo de detritos da poeira botânica [8]. Os primeiros registos da utilização da palinologia como ferramenta forense foram descritos por Erdtman em 1956, seguindo-se vários palinólogos, nomeadamente, Mil-denhal na Nova Zelândia, Bryant nos Estados Unidos da América e Wiltshire no Reino Unido [2]. Um dos primeiros casos reportados foi em 1959 na Europa, onde o pólen presente no solo dos sapatos de um suspeito permitiu associá-lo à área da floresta onde um corpo tinha sido encontrado [9]. A palinologia forense também já se mostrou capaz de fornecer evidências entre contactos de objetos e locais, tendo estas evidências permitido a localização de depósitos clandestinos de restos de cadáveres em valas comuns, a estimativa do tempo de deposição e estabelecer a origem de objetos e materiais [2, 10, 11].

A utilidade dos palinomorfas (pólen e esporos) como ferramenta forense resulta do seu tamanho microscópico, produção em elevado número e dispersão, elevada resistência a degradação mecânica, biológica e química e a sua morfologia que permite a identificação taxonómica [7, 11].

O principal objetivo desta dissertação foi estudar a aplicação da análise palinológica em diferentes tecidos biológicos e no solo de sapatos provenientes de humanos vivos (voluntários), e avaliar a sua utilidade em contexto forense. Pretendeu-se sistematizar métodos de amostragem capazes de serem aplicados, sem entropia, nas investigações forenses. Também se procedeu à avaliação da eficiência de cada tecido amostrado como armadilha polínica e à variação espacial e temporal dos tipos polínicos encontrados nas diferentes amostras.

## Capítulo 2

# Estado da Arte

*A palinologia é o ramo da botânica que estuda os grãos de pólen, esporos e outras partículas orgânicas microscópicas resistentes a ácidos, que no seu coletivo se designam palinomorfos. Esta ciência quando aplicada na resolução de processos legais permite o estabelecimento de relações, nomeadamente entre suspeitos e objetos com locais de crime e/ou vítimas. Pertencendo os palinomorfos às “provas silenciosas”, encontram-se presentes nos mais diversos meios sem serem observados a olho nu (solos, fibras, cadáveres, entre outros) e lá permanecem sem sofrer destruição por longos períodos de tempo.*

*Neste capítulo é apresentada a palinologia enquanto ciência, os seus objetivos e objetos de estudo. É também efetuado um levantamento bibliográfico sobre a aplicação da palinologia em contexto forense.*

## 2.1 Palinologia

O termo palinologia foi descrito por Hyde e Williams em 1944 [2], e deriva do verbo Grego *palynein*, que significa espalhar ou polvilhar [12, 13].

Esta ciência é o ramo da botânica que se dedica ao estudo dos palinomorfs, como os grãos de pólen e os esporos [12]. A análise polínica moderna foi criada por Lennart von Post como ferramenta para estudos geológicos, permitindo a correlação e datação de diferentes estratos. Porém com o surgimento de novos e melhores métodos, como por exemplo a datação pelo  $C_{14}$  a análise palinológica deixou de ser usada para este fim, no entanto, esta análise apresentava um elevado potencial noutras áreas de pesquisa e investigação [12]. A elevada aplicabilidade da palinologia deve-se às características dos palinomorfs e à sua presença nos mais diversos materiais, como indicado na tabela 2.1.

Tabela 2.1: Materiais onde foi aplicada com sucesso a análise palinológica [2, 12, 14].

A-F	G-P	P-Z
Animais	Garrafas térmicas	Pavimentos
Armas	Gelo	Pele
Bancos de madeira	Húmos	Plantas e suas superfícies
Bonecos de criança	Latas de gasolina	Preservativos
Botas/Calçado	Livros e papel	Roupa
Cabelos	Madeira e metais	Sacos de chá
Cavidades nasais	Material vegetal em decomposição	Solos
Conteúdo estomacal	Meias	Tecidos
Conteúdo intestinal	Mel e outros alimentos	Tecido subungueal
Cordas e cestos	Mobiliário	Telhados
Drogas	Ninhos de formigas	Veículos
Ferramentas	Notas contrafeitas	Vernizes
Fezes	Obras de arte	Vômito
Folhas de plástico	Paredes	Zaragatoas

Devido à sua versatilidade esta ciência pode ser aplicada na resolução de processos legais (direito civil e penal) entrando no âmbito da Palinologia Forense. A Palinologia Forense já se mostrou capaz de fornecer evidências entre contactos de objetos e locais. A constante transferência dos palinomorfs assenta no princípio de troca de Locard, que defende que todo o contacto deixa um vestígio [5]. Este princípio funciona como base de toda a investigação policial [15].

Na investigação forense, os palinomorfs mais utilizados são os grãos de pólen e esporos de plantas. O nosso trabalho debruçou-se na análise de grãos de pólen presentes nas diferentes amostras recolhidas.

## 2.2 Grãos de Pólen

Nas plantas, à semelhança dos animais, a reprodução sexual assenta na união das células sexuais masculinas e femininas, os gametas. No momento da sua união dá-se a fecun-



dação, processo que origina o zigoto, estrutura que se desenvolve num novo indivíduo [16]. Nas plantas a reprodução ocorre em duas gerações distintas (a geração haploide caracterizada pelo gametófito e a geração diploide caracterizada pelo esporófito), sendo o esporófito a geração dominante. O esporófito é a estrutura que se desenvolve a partir do zigoto resultante da reprodução sexuada. Esta estrutura é responsável pela produção dos esporos, células haploides que resultam da divisão celular por meiose, que quando germinam dão origem ao gametófito; nas plantas superiores os esporos originam órgãos especializados que serão os responsáveis pela produção dos gametas, sendo que nas gimnospermas os gametas femininos e masculinos desenvolvem-se no mesmo órgão enquanto que nas angiospermas tem origem em órgãos diferentes [16]. Os grãos de pólen, sendo o gametófito masculino, desenvolvem-se nas anteras que são considerados os microsporângios. Na figura 2.1 é apresentado um corte transversal de uma antera, constituída por dois lóbulos, cada um deles contendo dois sacos polínicos os microsporângios, onde ocorre o desenvolvimento dos grãos de pólen.

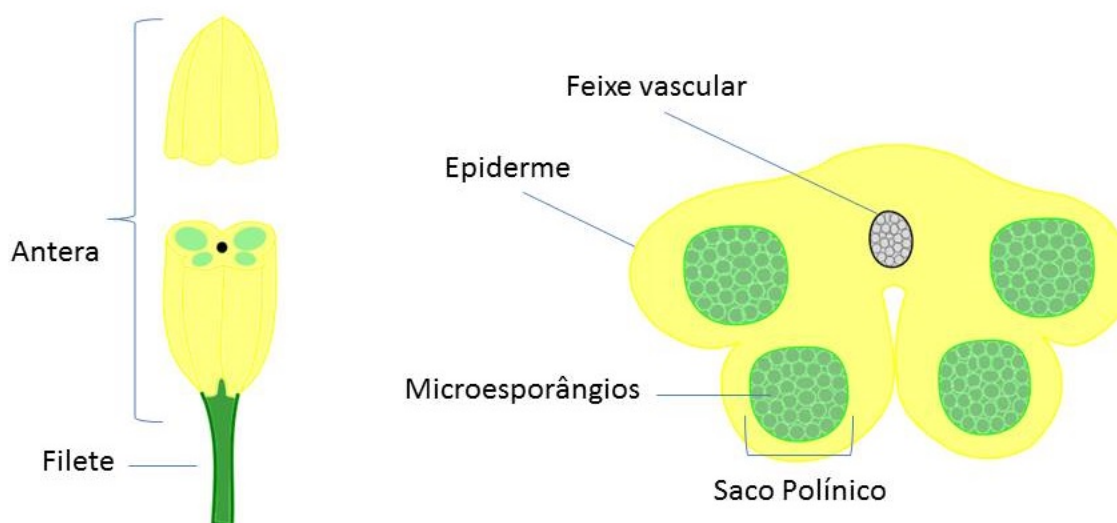


Figura 2.1: Estame e corte transversal de uma antera.

Os lóbulos da antera encontram-se fundidos por um tecido conjuntivo constituído por células vegetativas com um feixe vascular. A ligação da antera ao receptáculo da flor dá-se através do filete [17].

Após a formação dos meiócitos estes passam por diversos processos de divisão celular de mitose até atingirem a fase de grãos de pólen, sendo posteriormente libertados na atmosfera para atingirem o estigma da planta. Quando em contacto com o estigma ocorre a germinação do grão de pólen com emissão e desenvolvimento do tubo polínico para onde migram o núcleo vegetativo e a célula germinativa. Nesta fase dá-se a mitose do núcleo germinativo e formam-se os dois gametas masculinos que são libertados para o saco embrionário. Um gameta fecunda a oosfera e o outro liga-se à célula central formando o endosperma. Da dupla fecundação forma-se o embrião ( $2n$ ) que originará novas plantas [18]. Na figura 2.2 encontra-se esquematizado o ciclo de vida das plantas para uma melhor compreensão.

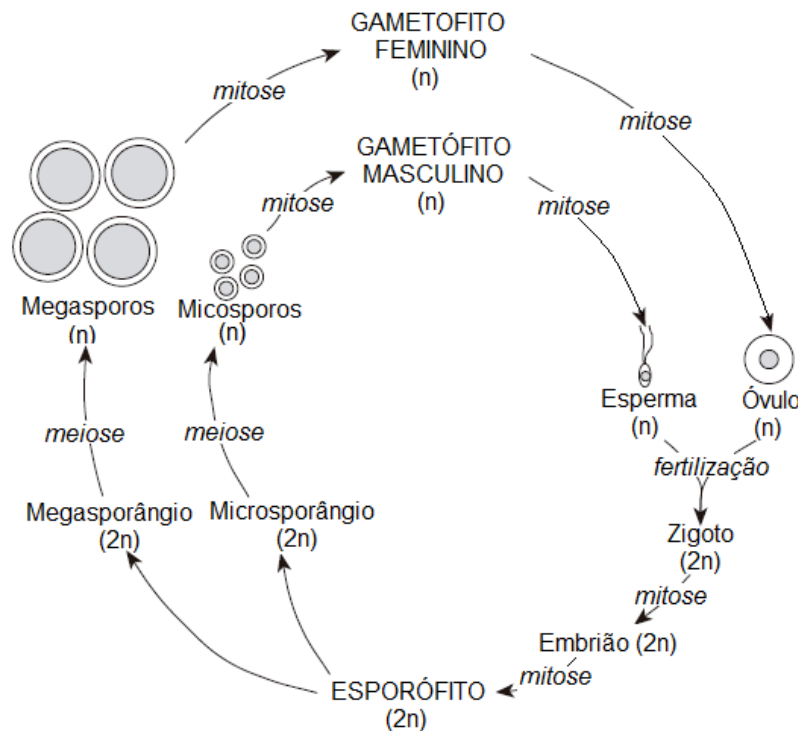


Figura 2.2: Ciclo reprodutor das plantas (angiospérmicas): ciclo haplodiplonte.

A função principal do pólen é a fecundação, porém uma grande quantidade é perdida [16] e no contexto forense é este pólen que tem interesse.

O grão de pólen maduro apresenta uma parede celular que tem como função primária o suporte estrutural e proteção do conteúdo citoplasmático de danos mecânicos e da desidratação a que os grãos são sujeitos durante a sua dispersão [1, 19]. Assim, a parede celular é composta por duas camadas, a intina e a exina [19]. A intina corresponde à camada que rodeia o protoplasma, sendo parcialmente composta por calose, esta parede apenas permanece enquanto o protoplasma do grão de pólen se mantém viável [1]. A exina confere a maior resistência e suporte ao citoplasma, esta parede mais externa é composta por esporopolenina, uma substância descrita por Hesslop-Harrison 1973 [1, 19]. A esporopolenina é bastante resistente ao decaimento mecânico, bem como a altas temperaturas e tratamentos com ácidos concentrados. A resistência ao decaimento especialmente sobre condições anaeróbicas permite que o pólen e os esporos resistam como micro-fosseis [19]. Sob condições aeróbicas a exina fica suscetível à quebra por degradação enzimática, fúngica e outros microrganismos [1]. A exina pode ser dividida em duas camadas bem definidas: a endexina que consiste numa camada homogênea imediatamente após a intina, e a ektoexina que forma a camada mais externa e que pode exibir uma variedade de estruturas, nomeadamente a camada basal, a columela e o tecto [12, 13, 19], podendo algumas destas não se encontrarem presentes (figura 2.3). A observação destas estruturas apenas é possível com microscopia eletrônica. Na observação através de microscopia óptica é possível a diferenciação da exina em duas camadas designadas por nexina e sexina. A nexina refere-se à camada interna que inclui a endoexina e a camada basal da ektoexina, enquanto que a se-

xina se refere às estrutura exteriores, incluindo a columela, o tecto e os elementos estruturais do tecto (caso estes se encontrem presentes) [12, 19, 20].

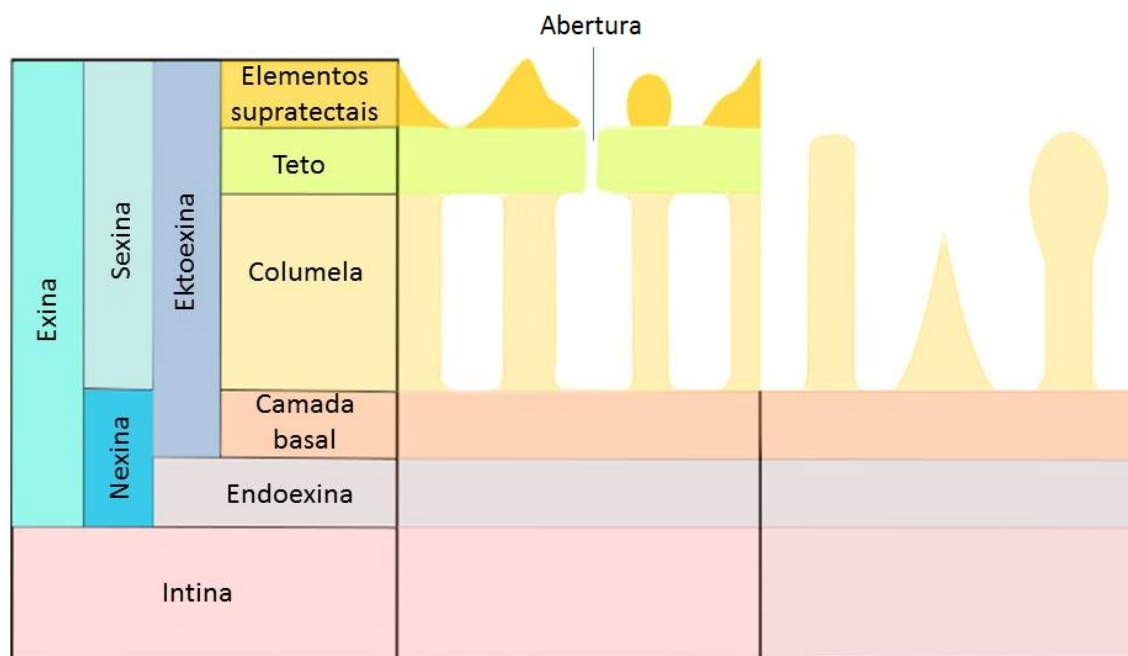


Figura 2.3: Estrutura da parede celular dos grãos de pólen.

## 2.2.1 Morfologia

Os grãos de pólen apresentam um elevado número de características morfológicas e ultra estruturais que têm elevado interesse para a taxonomia e filogenia, permitindo a identificação de espécies através do pólen. Assim, numa perspetiva de identificação as características morfológicas do pólen mais relevantes são o tamanho, polaridade, simetria, forma, aberturas (forma, número e posição) e a ornamentação da exina [18].

### 2.2.1.1 Tamanho

Relativamente ao tamanho, os grãos de pólen podem variar entre menos de 10  $\mu\text{m}$  até mais de 100  $\mu\text{m}$  sendo a variação de tamanho mais comum entre os 20 e os 50  $\mu\text{m}$  (aproximadamente metade do diâmetro do cabelo humano). Para o estabelecimento desta característica é utilizado o maior diâmetro do pólen [12, 13, 1]. Em função do seu tamanho os grãos de pólen podem ser divididos como indicado na tabela 2.2 [12, 13].

Tabela 2.2: Classificação dos grãos de pólen em função do tamanho.

Tamanho (classes)	Medida ( $\mu\text{m}$ )
Gigante	> 200
Muito grande	200 - 100
Grande	100 - 50
Médio	50 - 25
Pequeno	25 - 10
Muito pequeno	< 10

A característica tamanho não pode ser usada individualmente como elemento identificativo, sendo essencial ter em atenção vários fatores como o grau de hidratação e o método de preparação, que alteram o tamanho do pólen [13].

### 2.2.1.2 Polaridade

No estágio de tétrada de micrósporos [12, 13] é possível estabelecer um eixo designado de eixo polar, utilizado como referência espacial, que passa pelo centro da tétrada. A interseção desse eixo com as superfícies de cada micrósporo permite identificar dois polos distintos: o polo proximal resultante da interseção do eixo polar com a superfície do micrósporo mais próxima do centro do tétrada e a área envolvente a esta interseção é designada de face proximal, enquanto que o polo distal resulta da interseção com a superfície mais afastada do centro da tétrada designando-se de face distal, direcionada para o exterior [12, 13, 19]. Assim, os grãos de pólen, relativamente à sua polaridade, classificam-se como isopolares, heteropolares e apolares como observável na figura 2.4.

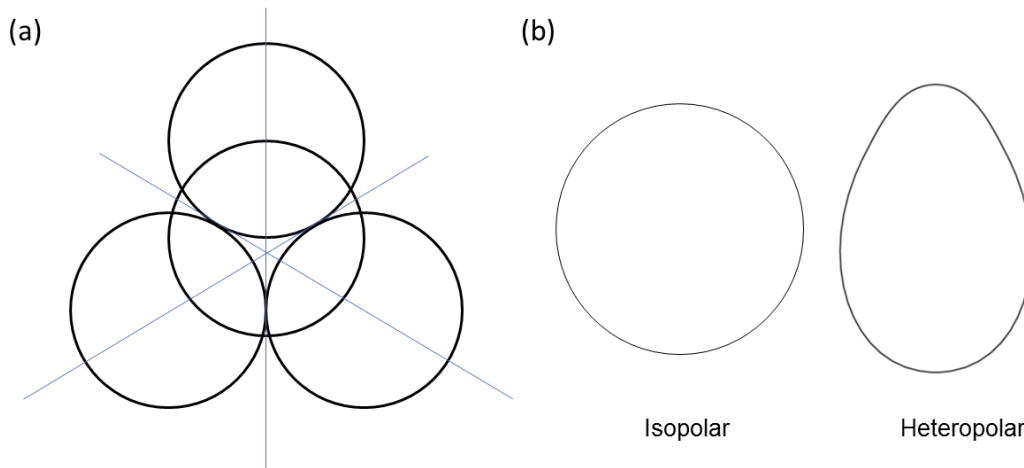


Figura 2.4: Polaridade dos grãos de pólen. (a) Representação dos eixos polares numa tétrada de micrósporos. (b) Classificação dos grãos de pólen em função da sua polaridade em isopolares e heteropolares.

Nos grãos de pólen isopolares os polos proximal e distal são semelhantes, funcionando

o plano equatorial como plano de simetria, enquanto que nos grãos de pólen heteropolares os dois polos diferem entre si. Existem ainda os grãos de pólen apolares, que não apresentam qualquer tipo de polaridade, e como tal não podem ser distinguidas as regiões polar e equatorial após a desagregação da tétrada [12, 19]. A polaridade dos grãos de pólen é uma característica que afeta diretamente a forma e a localização das aberturas [13].

### 2.2.1.3 Simetria

Os grãos de pólen são marcadamente simétricos, sendo que a maioria dos grãos apresentam simetria radial, com um plano de simetria horizontal e dois ou mais planos de simetria verticais. Nestes casos, os eixos verticais apresentam o mesmo tamanho (equilongos). Existem também grãos com simetria bilateral que têm dois planos de simetria, onde os seus eixos equatoriais não são equilongos. Por vezes a distinção entre a simetria radial e bilateral é difícil [12, 19].

### 2.2.1.4 Forma

A forma dos grãos de pólen é determinada pela relação entre o comprimento polar (P) e o diâmetro equatorial (E) do grão de pólen (P/E), como representado na figura 2.5 [13]. Esta relação permite estabelecer três classes principais relativamente à forma dos grãos de pólen, sendo elas: grão de pólen oblado, nos casos em que o diâmetro equatorial é superior à distância entre polos implicando que a relação P/E seja inferior a 1; grão de pólen esferoidal, onde o comprimento polar e o diâmetro equatorial são muito semelhantes sendo a relação P/E igual ou muito próxima de 1; grão de pólen prolado, quando a distância entre os polos é superior à distância equatorial e deste modo a relação P/E é superior a 1.

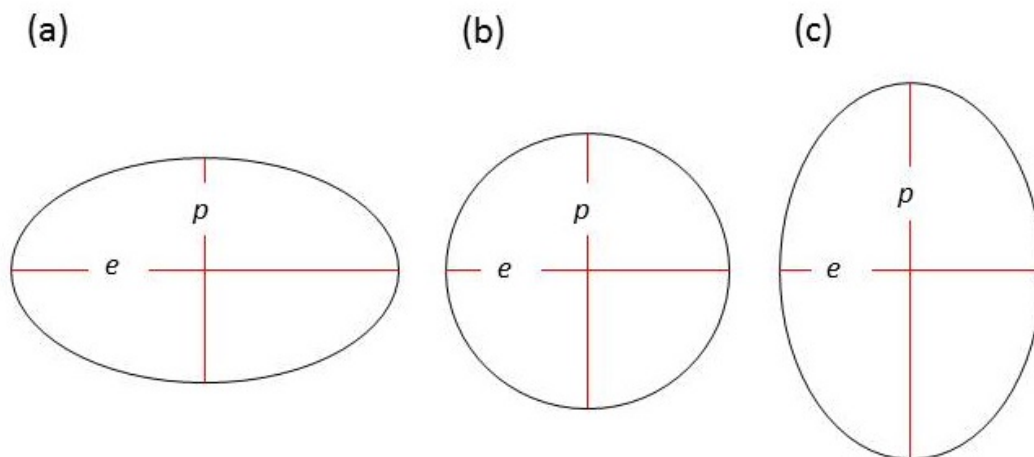


Figura 2.5: Forma dos grãos de pólen em função da relação entre o eixo polar e o eixo equatorial: (a) oblado (b) esferoidal (c) prolado.

As classes principais podem ainda ser divididas em sub-classes, apresentadas na tabela

2.3. Existem também exceções ocorrendo pólen com forma triangular, pentagonal, entre outras.

Tabela 2.3: Classificação dos grãos de pólen pela sua forma, estabelecida através da relação P/E.

Forma (classes)	P/E ( $\mu\text{m}$ )
Peroblado	< 0,55
Oblado	0,55 - 0,75
Suboblado	0,75 - 0,88
Globosa oblado	0,88 - 1
Esferoidal	1
Globosa prolado	1 - 1,14
Subprolado	1,14 - 1,33
Prolado	1,33 - 2
Perprolado	> 2

#### 2.2.1.5 Aberturas

As aberturas dos grãos de pólen são regiões mais finas e delimitadas da exina especializadas para a libertação do tubo polínico durante a sua germinação [19, 20, 13].

As aberturas dos grãos de pólen podem ser em forma de poro ou fenda, sendo os grãos de pólen designados de porados ou colpados, respetivamente. Há situações em que os grãos podem apresentar em simultâneo os dois tipos de aberturas, sendo então designados como colpados. Raros são os casos onde não são reconhecidas aberturas porém estes grãos são designados de inaperturados (ou atremes) e, no caso de as aberturas se encontrarem visíveis mas irregulares, estes grãos são designados de anomotremes [12, 19]. Os tipos de aberturas são classificados em função da forma, número, posição, tamanho e estrutura. As classificações existentes são várias, porém a descrita por Erdtman (1969) é a mais recorrente e esta assenta no número, posição e forma das aberturas, estando apresentada na figura 2.6.

#### 2.2.1.6 Ornamentação da exina

Em diversos tipos de pólen a superfície do tecto encontra-se ornamentada com projeções, que proporcionam uma variedade ornamentações da exina. Estas características esculturais podem ser observadas por microscopia ótica, sendo observados com maior detalhe através de microscopia eletrónica de varrimento [19, 20]. São vários os tipos de ornamentação da exina que o pólen pode apresentar, porém as classificações dessas ornamentações são categorias artificiais que marcam os extremos dentro de uma ampla variedade morfológica (figura 2.7). A combinação de diferentes elementos esculturais é também comum [13, 19].
























ATREME	NOMOTREME							ANOMOTREME
No	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8
								
	MONO	DI	TRI	TETRA	PENTA	HEXA	POLY	
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	
								
		CATA	ANACATA	ANA	ZONO	DIZONO	PANTO	
	C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
								
	TREME	LEPT	TRICHO TOMO COLPATE	COLPATE	PORATE	COLP ORATE	POR ORATE	

Figura 2.6: Classificação das aberturas presentes nos esporos e grãos de pólen, descrita por Erdtman em função do número, posição e localização (classificação NPC) [12].

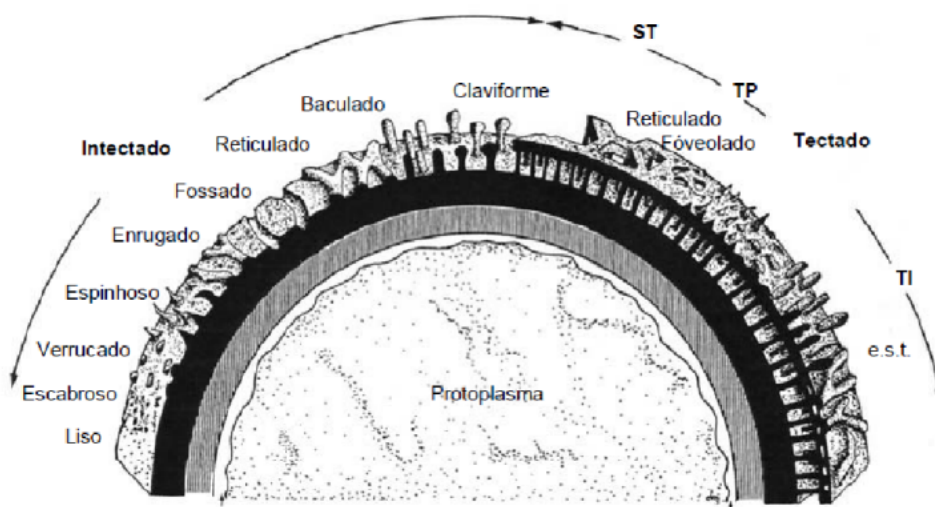


Figura 2.7: Tipos de ornamentação da exina.

Esta característica escultural é discriminativa dos tipos de pólen aquando a sua identificação. A descrição por palavras da ornamentação é uma tarefa difícil, porém um olho treinado consegue com facilidade fazer a distinção e assim a correta identificação dos tipos polínicos [13].

### **2.2.2 Métodos de dispersão**

Os mecanismos de dispersão do pólen facilitam a polinização de modo a garantir que um número suficiente de grãos atinja o seu destino funcional [21]. Esta característica é um fator de relevo na análise palinológica, pois as várias estratégias de polinização irão influenciar o número de grãos de pólen presentes nas amostras [22].

O modo de dispersão de pólen permite classificar as plantas nos seguintes grupos (a) entomófilas, (b) anemófilas e (c) hidrogâmicas. As plantas entomófilas (a) têm como vetor de transporte do pólen os insetos, aves e mamíferos. Estas plantas têm uma taxa de produção de pólen relativamente reduzida, sendo os seus recursos canalizados em características atrativas para os animais, como por exemplo a produção de néctar, odor e cor. O pólen deste tipo de plantas apenas é transferido pelos polinizadores quando entram em contacto com a planta e para o solo quando esta morre e se decompõe. Deste modo este tipo de pólen quando encontrado em contexto forense pode ser de elevado interesse, pois constitui um excelente indicador de contacto e de proximidade da fonte de proveniência [11, 21, 23, 24, 25]. As plantas anemófilas (b) utilizam o vento como vetor de dispersão e devido ao elevado risco de perda de pólen estas plantas produzem um elevado número de grãos de pólen. Estas plantas, ao contrário das entomófilas, não necessitam de ser atrativas e, portanto, evoluíram no sentido de permitir a livre e fácil dispersão do pólen sem qualquer tipo de impedimento. Mesmo que o pólen das plantas anemófilas possa ser encontrado sobre-representado no ar e no solo ele continua a ser um importante marcador no contexto forense pois são extremamente aerodinâmicos, apresentam elevada resistência e são encontrados em várias superfícies [11, 21, 23, 24, 25]. Finalmente, nas plantas hidrogâmicas (c) a dispersão do seu pólen é feita através da água. Estas plantas produzem também um elevado número de grãos, mas relativamente pequenos. Porém este tipo de pólen não é de interesse forense pois quando recolhidos já se encontram danificados [11, 23, 24, 25].

## **2.3 Aplicações Forenses da Palinologia**

A palinologia é utilizada nos mais diversos cenários de investigação forense. As provas palinológicas permitem estabelecer relações e contactos entre cenas de crimes e suspeitos/vítimas, bem como objetos e indivíduos ou locais através da comparação entre amostras forenses e amostras controlo [11, 23, 21]. É possível através de uma avaliação qualitativa sumária do conteúdo polínico de uma amostra, a confirmação de alegados locais de crime indicados pelas vítimas [14], bem como a avaliação de testemunhos e álibis apresentados pelos suspeitos [26, 27]. Esta avaliação torna-se mais rápida e menos dispendiosa que uma análise palinológica completa e posterior elaboração do perfil polínico, e apesar de não ser tão detalhada como o perfil polínico apresenta o detalhe suficiente na orientação do investigador para a condução do interrogatório [26].



As provas palinológicas, também, podem ser utilizadas, juntamente com outro tipo de evidências, em casos de agressões sexuais. Neste tipo de crimes, o recurso às provas palinológicas permite estabelecer o local da agressão, e caso a vítima indique um alegado local do crime confirmar essa informação [14, 26, 9, 28, 29, 30]. Neste tipo de crimes a amostragem para análise do conteúdo polínico pode ser realizada em vários locais, através de zaragatoas [14]. Um exemplo da aplicação da palinologia forense em casos de agressões sexuais é o caso descrito por Mildenhall [14], onde durante a investigação o local exato da agressão tornou-se uma incógnita. A zona envolvente do local indicado pela vítima possuía um arbusto muito comum na Nova Zelândia designado *Coprosma* e que produz elevado número de grãos de pólen facilmente transportados pelo vento. As amostras recolhidas, no alegado local do crime, apresentavam abundante quantidade de pólen, porém o pólen do local era pouco comum pois apresentava crescimento de hifas fúngicas que penetraram nos poros dos grãos de pólen. Esse mesmo pólen foi encontrado em várias amostras da vítima, que indicam o contacto desses tecidos da vítima com o solo do local que esta indicou como sendo o local da agressão [14].

A amostragem para análise palinológica pode ser efetuada em vários tecidos biológicos, em casos de cadáveres em distintos estados de decomposição, até mesmo esqueletizados. O caso descrito por Arguelles e colaboradores [31] demonstra a amostragem e análise palinológica do trato intestinal de um cadáver mumificado. Um coprólito recuperado do intestino foi reidratado e posteriormente submetido a análise palinológica. Deste estudo foram identificados vinte tipos de pólen que permitiram inferir sobre o período do ano em que ocorreu o óbito, nomeadamente entre novembro e fevereiro (inverno). Foram também possíveis retirar várias informações relativas à dieta praticada pelo indivíduo nos dias antecedentes ao óbito [31, 32].

Nos casos de valas comuns deve proceder-se in loco ao recurso à palinologia forense em conjunto com a geologia de modo a verificar se é o local de depósito dos restos cadavéricos ou se estes foram trasladados [32, 10]. Entre 1997 e 2002 foram realizadas exumações de valas comuns no NE da Bósnia associadas ao massacre de civis durante a guerra. Antes das exumações sabe-se que a vala comum original foi exumada e os corpos movidos para várias valas secundárias. Os dados resultantes da análise palinológica e geológica forense permitiram ligar os cadáveres das valas secundárias com a vala primária, permitindo assim estabelecer que os corpos encontrados nas valas secundárias pertenciam a civis mortos por crimes de guerra que foram inicialmente colocados na vala primária e posteriormente transferidos de local [10].

Os dados ambientais resultantes da análise palinológica forense podem também ser comparados com os resultados de amostragens aerobiológicas e calendários polínicos. É exemplo deste tipo de aplicação da palinologia o estudo de Montali e colaboradores [32]. Entre 2003 e 2004 foram recolhidas amostras de diferentes tecidos biológicos em 47 cadáveres transportados para o serviço de medicina legal de Parma (Norte de Itália). O pólen identificado foi comparado com os dados das estações de amostragem aerobiológica. Com base nos calendários polínicos foi possível estabelecer três grupos que permitiram o enquadramento do óbito numa estação do ano [33].

Os corpos são excelentes armadilhas polínicas quer em indivíduos vivos ou cadáveres com reduzido estado de decomposição. O corpo humano aprisiona eficazmente pólen e esporos, sendo possível encontrar conteúdo polínico nos mais diversos tecidos [32]. Durante a vida um indivíduo, pela respiração, inspira o ar atmosférico contendo não só o oxigénio ne-

cessário bem como outras partículas que se encontram livres na atmosfera, como os esporos e grãos de pólen. Estas partículas ficam aprisionadas nas cavidades nasais, permitindo a sua colheita através de zaragatoas ou em casos de cadáveres através da lavagem destas cavidades [34]. O estudo de um tecido biológico quando efectuado em conjunto com outros tecidos permite estabelecer relações entre indivíduos e locais, principalmente estabelecer um intervalo temporal [34, 35].

O recurso à palinologia forense em casos de consumo de substâncias ilícitas ou envenenamento tem sido, também, demonstrado. Através da colheita de várias amostras (a partir do conteúdo gástrico bem como objetos recolhidos na residência da vítima) foi possível identificar várias substâncias psicotrópicas, derivadas de plantas e fungos ilícitos, consumidos e manuseados pela vítima [36].

O cabelo tem a capacidade de atrair partículas através de forças eletrostáticas. Deste modo, o pólen pode permanecer nos cabelos indefinidamente, dependendo da frequência de lavagem do mesmo [23, 32, 37]. Wiltshire [37] descreve dois casos de homicídio onde o conteúdo polínico recolhido dos lavados de cabelo foi útil à investigação. Nestes casos, a análise palinológica foi aplicada de forma a verificar se o local onde foram encontrados os cadáveres era o alegado local do crime.

Além dos tecidos biológicos, que funcionam como armadilhas de palinomorfos existem amostras não biológicas de interesse. Temos por exemplo os solos que funcionam como eficaz fonte de armazenamento de palinomorfos que se depositam naturalmente ou com a chuva e após a morte e degradação das plantas os grãos de pólen que estas contêm ficam armazenados no solo. Deste modo é comum a análise palinológica ocorrer em conjunto com a análise geológica forense. Vários são os estudos que analisam a variação de conteúdo polínico associado a diferentes amostras de solo [38, 23, 39, 40].

Também as roupas e o calçado são comumente submetidos a análise palinológica. O calçado devido ao seu constante contacto com o solo e as roupas devido às suas fibras, que à semelhança do cabelo, por efeito da sua força eletrostática aprisiona os palinomorfos. Vários são os casos descritos em que o recurso à análise palinológica do calçado e roupas foi essencial à investigação através do estabelecimento de relações entre locais e indivíduos. É de salientar que o resultado da análise palinológica em roupas pode diferir em função do local de amostragem. Esta diferenciação deve-se à diferente exposição dos diferentes locais aos meios que contêm ou transportam palinomorfos [14, 23, 26, 41, 42, 43, 44].

Os veículos, motorizados ou não, podem ser também amostrados para análise palinológica, recolhendo-se amostras por exemplo dos pedais, rodas, tapetes, bancos e até mesmo dos filtros [7, 15, 42]. A existência de conteúdo polínico em veículos queimados foi verificada por Morgan et al [45] através da exposição de três tipos de pólen a temperaturas elevadas entre 30 s e 1440 min (24h) [45].

A existência de plantação de drogas ilegais, como por exemplo a marijuana pode também ser monitorizada através de análise palinológica. Através de amostragens aerobiológicas, a identificação de pólen de marijuana pode indicar a existência de plantações, relativamente próximas [23].

A palinologia forense não deve ser uma ferramenta exclusiva de crimes ocorridos em ambientes abertos. Morgan e colaboradores [46] realizaram estudos da distribuição do pólen em ambiente interior tendo verificado, numa sala, a distribuição espacial e temporal dos palinomorfos. Relativamente à distribuição espacial observaram uma diminuição da quantidade de pólen relativamente à zona de emissão, tendo sido a maioria do pólen recolhido a

0.8 metros da fonte. No entanto, quanto à distribuição temporal foi possível encontrar 25 a 32% do pólen original passados 20 dias após a remoção da planta da sala [46]. A análise palinológica de documentos em casos de alegada fraude foi também demonstrada [47].

Mais recentemente a aplicação da biologia molecular tem sido usada nomeadamente através da identificação de DNA proveniente dos grãos de pólen. Schield et al [41] descreveram a presença de pólen em têxteis bem como a extração de DNA do pólen recolhido. A extração e consequente amplificação do material genético permitem a identificação até à espécie da planta que originou o grão de pólen e a deteção de diferenças genéticas dentro da mesma espécie provenientes de áreas geográficas distintas. Estes processos estão em expansão não sendo até então frequentemente utilizados pois ainda ocorrem problemas como: inexistência de bases de dados contendo as sequências de DNA dos marcadores genéticos para a maioria das plantas com semente, de marcadores genéticos que possam ser amplificados para as plantas com sementes e de métodos apropriados para o isolamento e sequenciação do DNA de plantas, nomeadamente dos grãos de pólen [48].



## Capítulo 3

# Materiais e Métodos

*A correta amostragem e tratamento laboratorial, são imprescindíveis para uma correta interpretação e publicação dos resultados em qualquer estudo científico. No contexto forense esses momentos da investigação são ainda mais cruciais, uma vez que a cadeia de custódia deve ser mantida de modo a garantir a integridade das evidências, e a ausência de contaminação na amostragem e tratamento são fundamentais para a correta interpretação dos resultados obtidos.*

*Neste capítulo são descritos os métodos de amostragem utilizados para os diferentes tipos de material, bem como a análise palinológica, incluindo o tratamento laboratorial, identificação e contagem dos palinomorfos.*

### 3.1 Colheita das Amostras

A correta amostragem é a base do sucesso no trabalho experimental, tendo de ser realizada com recurso a métodos válidos de modo a produzir amostras representativas. Assim, a amostragem carece de um cuidadoso planeamento, devido aos diferentes métodos a aplicar para diferentes materiais. A inexistência de contaminação durante a recolha, armazenamento e tratamento das amostras é também fundamental, para tal devem ser utilizados instrumentos esterilizados e os materiais de recolha, como luvas e espátulas, devem ser frequentemente substituídos e esterilizados sempre que se proceda à amostragem de um novo material.

Neste estudo, a análise foi realizada em humanos vivos, aos quais foram amostrados 3 tecidos biológicos, nomeadamente o cabelo, tecido subungueal e cavidades nasais. Foi também recolhida uma amostra proveniente da sola dos sapatos. As amostras foram recolhidas de 50 voluntários (20 voluntários em duas estações do ano distintas, num total de 40 voluntários; 10 voluntários amostrados após serem expostos, pelo mesmo período de tempo, ao mesmo local) de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 15 e 60 anos, entre novembro de 2016 a maio de 2017. Todos os participantes foram informados acerca dos objetivos do projeto e seus procedimentos, tendo por fim declarado o seu consentimento livre e informado (Anexo). Este estudo foi submetido a avaliação pela comissão de Ética do Centro Hospitalar de São João e Faculdade de Medicina da Universidade do Porto tendo sido aprovado. Após a colheita, as amostras foram transferidas para contentores plásticos herméticos e estéreis devidamente identificados e armazenados até serem submetidas a tratamento laboratorial. As amostras foram armazenadas a 4°C para intervalos não superiores a 48h entre a colheita e tratamento laboratorial, e a -20°C para intervalos de tempo entre a colheita e tratamento superiores a 48h. O transporte das amostras foi realizado em contentores térmicos de modo a garantir as condições de armazenamento. De forma a garantir a confidencialidade dos participantes no estudo, estes foram sujeitos a codificação alfanumérica garantindo assim a anonimização exigida.

#### 3.1.1 Cabelo

O cabelo é um tecido que se encontra constantemente exposto ao meio envolvente e devido às forças eletrostáticas que apresenta funciona como armadilha das partículas presentes no ar que passa através dele. Entre as mais diversas partículas encontram-se os grãos de pólen e os esporos. Esta capacidade de aprisionamento e a constante exposição conferem a este tecido interesse para análise palinológica forense, permitindo inferir sobre locais e intervalos temporais de exposição, podendo a sua análise fornecer informações complementares em contexto forense.

Os palinomorfos e restantes partículas ficam armazenados no cabelo até que os indivíduos procedam à sua lavagem, que leva a que as forças eletrostáticas sejam descarregadas. Deste modo, o método selecionado para a colheita de palinomorfos neste tecido foi a sua lavagem utilizando um detergente anti-microbiano diluído e aquecido a 30°C em banho-maria. Neste estudo o detergente utilizado foi o Triton (X100 Sigma Aldrich) diluído para uma concentração de 2%.

Para a realização da lavagem foi colocado um recipiente limpo num suporte ou mesa de apoio, sobre o qual o indivíduo inclinou a cabeça apoiando-se, como demonstrado na

figura 3.1.1. Um pequeno volume de detergente foi aplicado no cabelo que seguidamente foi esfregado e agitado vigorosamente durante alguns minutos de forma a descarregar as forças eletrostáticas, posteriormente o cabelo foi enxaguado com água destilada. O enxaguamento deve ser o mais completo possível de modo a permitir a retirada de todo o detergente do cabelo bem como de todas as partículas que este contém.

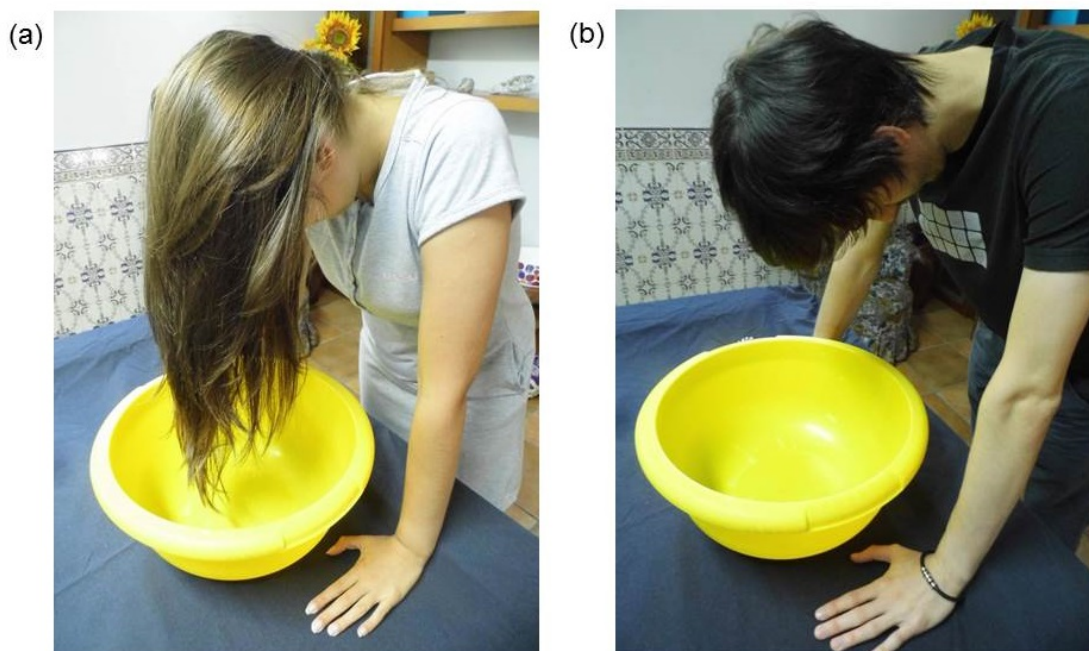


Figura 3.1: Imagem demonstrativa da colheita de amostras em cabelos longos (a) e cabelos curtos (b).

Terminada a lavagem o conteúdo do recipiente foi transferido, com a ajuda de um funil, para um contentor. O recipiente de colheita deve também ser lavado com água destilada, bem como o funil e esta lavagem adicionada ao contentor que contém a amostra. Concluída a lavagem o contentor foi devidamente identificado, transportado e armazenado até ser efectuado o tratamento laboratorial.

### 3.1.2 Cavidades Nasais

Durante a vida, um indivíduo, pela respiração, inspira o ar atmosférico, contendo não só o oxigénio necessário, bem como outras partículas que se encontram livres na atmosfera, como os esporos e grãos de pólen. Estas partículas ficam aprisionadas na mucosa e pilosidade das cavidades nasais, permitindo a sua colheita. Este tecido, quando estudado em conjunto com outros tecidos permite estabelecer relações entre indivíduos e locais, mas acima de tudo estabelecer um intervalo temporal [34, 35]. Assim, com a informação obtida através da análise palinológica efectuada em amostras recolhidas nas cavidades nasais é possível estabelecer quando (estações do ano) e por vezes onde ocorreu a última respiração do indivíduo, antes da colheita.

O método de colheita menos invasivo e mais expedito é a utilização de zaragatoas, que são inseridas nas narinas e seguidamente é realizado o esfregaço. Em cada indivíduo foram efetuados no total quatro esfregaços (dois esfregaços na narina direita e dois esfregaços na narina esquerda), resultando assim quatro zaragatoas. Dado que a eletricidade eletrostática do pólen com a pilosidade e mucosa da cavidade nasal é elevada, o primeiro esfregaço foi realizado com a zaragatoa humedecida em Triton 2% (Sigma Aldrich X100), detergente antimicrobiano diluído, de modo a garantir que esta força é destruída ou fragilizada. O segundo esfregaço realizou-se com a zaragatoa humedecida em água destilada.

A realização de dois esfregaços serve também para contornar o problema da força eletrostática existente, não sendo deste modo aplicado um esfregaço isolado em cada narina, que pode não ser suficiente para remover o pólen deste tecido. Uma maior quantidade de esfregaços resulta numa maior viabilidade da amostragem. Assim sendo, para a amostragem a zaragatoa é inserida na narina até a sua passagem ser bloqueada pelas coanas, sendo de seguida esfregada no interior da cavidade nasal como representado na figura 3.1.2.

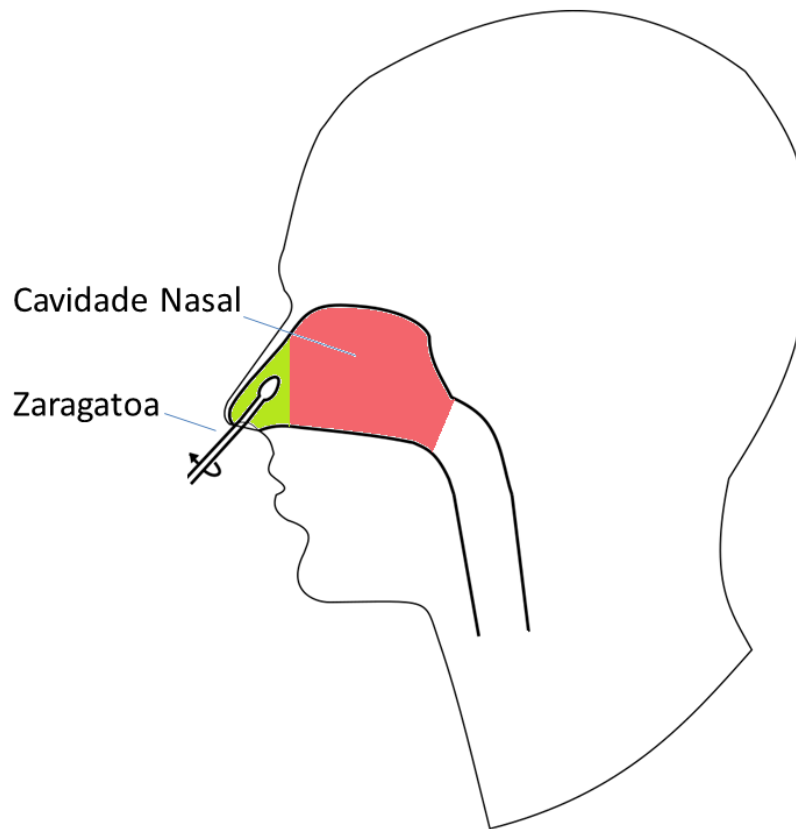


Figura 3.2: Representação da amostragem das cavidades nasais com recurso a uma zaragatoa, ilustrando a região amostrada (a verde) e a região não amostrada (a vermelho).

Após o esfregaço as zaragatoas são acondicionadas, em tubos de falcon devidamente identificados, transportadas e armazenadas até serem submetidas ao tratamento laboratorial.



### 3.1.3 Tecido Subungueal

O tecido subungueal das mãos permite acumular material ou partículas de interesse no estudo polínico e que poderão ser capazes de nos indicar atividades antes da amostragem, bem como indicar locais onde essas aconteceram. Entende-se por tecido subungueal o tecido que se encontra imediatamente sob as unhas das mãos bem como dos pés. Neste trabalho é apenas analisado o tecido subungueal das mãos.

A amostragem fez-se com recurso a raspagem, que permite a colheita de material de maiores dimensões e posterior lavagem para recolha do material de menores dimensões. Para a colheita foi colocada uma placa de petri sob a mão e efetuada a raspagem de todas as unhas individualmente com auxílio de uma espátula metálica. Após a raspagem, as unhas e o tecido subungueal foram humedecidos com detergente anti-microbiano diluído (Triton 2% (Sigma Aldrich X100)) e foram seguidamente esfregadas com uma escova de dentes, este processo assemelha-se ao processo de higienização comum das unhas (Figura 3.1.3). De seguida o tecido foi irrigado com água destilada de modo a recolher as partículas libertadas pela lavagem. Para finalizar foi feita a lavagem da escova com água destilada de modo a recolher todas as partículas que possam estar agarradas a este utensílio. O processo foi repetido para a outra mão. O resultado da amostragem foi transferido para um tubo de falcon com auxílio de um funil, o funil bem como a placa de petri foram lavados com água destilada e esta lavagem armazenada no contentor da amostra.

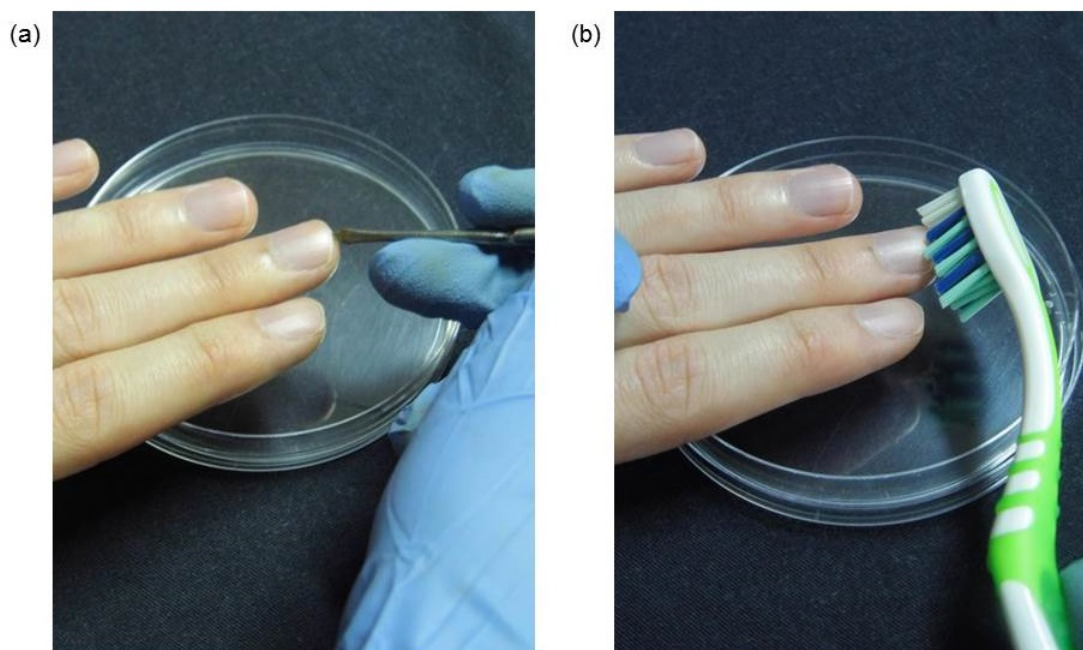


Figura 3.3: Demonstração da colheita de amostras no tecido subungueal em dois passos: (a) raspagem e (b) lavagem.

Terminada a amostragem os tubos de falcon serão corretamente identificados, para posterior transporte e armazenamento até ao material amostrado ser submetido a tratamento laboratorial.

### 3.1.4 Solo de Sapatos

O solo é um bom armazenador de palinomorfos, pois é neste que se encontram as plantas que os produzem e é a superfície na qual os palinomorfos se depositam sendo a análise palinológica deste meio bastante rica e informativa.

A colheita de solo presente nos sapatos foi realizada através da raspagem e lavagem dos mesmos. Os sapatos foram retirados e com recurso a uma espátula raspados para um tabuleiro os sedimentos de maior dimensão presentes na sola. Seguidamente foi colocado Triton 2% na sola e esta foi esfregada com o auxílio de uma escova de dentes, como se encontra demonstrado na figura 3.1.4. Após a esfrega procede-se ao enxaguamento com água destilada, sendo esta lavagem recolhida no tabuleiro. A escova foi lavada com recurso a água destilada.

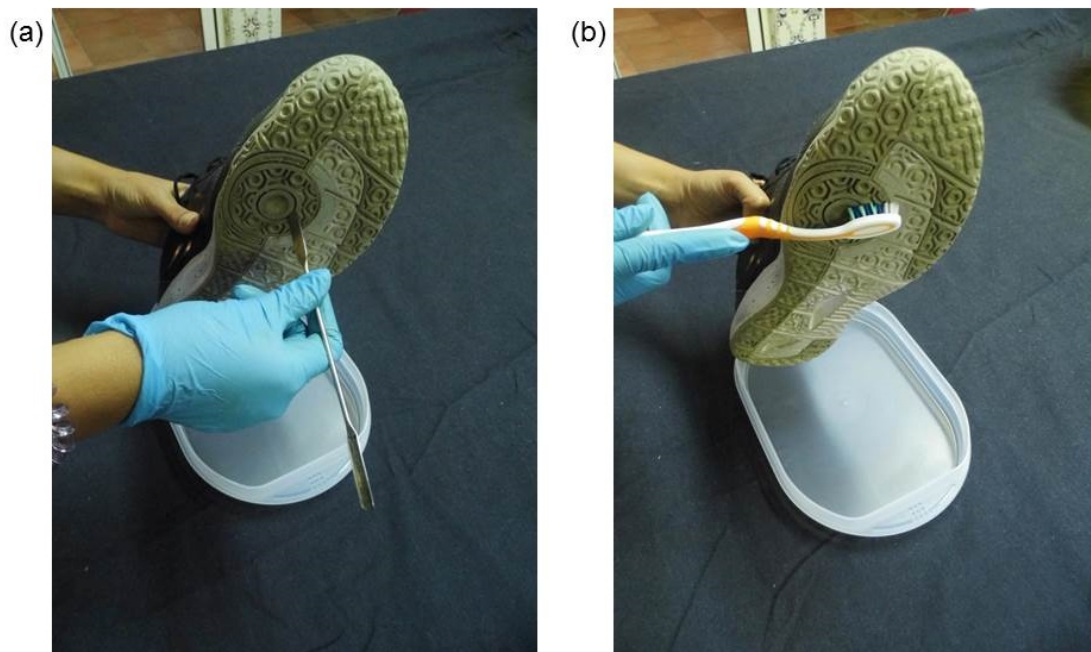


Figura 3.4: Demonstração da colheita de amostras na sola do calçado em dois passos: (a) raspagem e (b) lavagem.

Terminada a amostragem, o resultado foi transferido para um tubo de falcon com o auxílio de um funil. Após a transferência de todo o líquido de lavagem para o tubo procedeu-se à lavagem do tabuleiro e do funil com água destilada e esta lavagem é armazenada juntamente com a amostra. Os tubos contendo a amostra são corretamente identificados e conservados até que se proceda ao tratamento laboratorial do seu conteúdo.

### 3.2 Tratamento Laboratorial

O pólen apresenta diversidade morfológica que permite a sua identificação taxonómica sendo bastante resistente à degradação mecânica, química e biológica.

O processamento de amostras para análise palinológica é destrutivo uma vez que se torna necessário efetuar uma série contínua de procedimentos físico-químicos (que irão ser aplicados dependendo do tipo de amostra e da sua composição) com vista à obtenção de um resíduo rico em pólen. A obtenção deste resíduo é essencial para a perfeita qualificação e quantificação do espetro polínico presente numa amostra e com base nisso possam ser retiradas informações com interesse forense. Para isso recorre-se à combinação de diferentes reagentes químicos e processos físicos.

É fundamental evitar a contaminação da amostra que será submetida a análise polínica com fim forense. Para minimizar a contaminação é necessário recorrer a vários cuidados:

- Deve ser tratada uma amostra de cada vez durante a sub-amostragem para assim evitar a contaminação cruzada;
- Deve ser utilizado um par de luvas descartáveis por cada amostra e todo o material usado deve ser descartável ou de plástico para facilitar a limpeza;
- Todo o material reutilizável deve ser limpo com hipoclorito de sódio (lixívia comercial) para destruir os microrganismos eventualmente existentes;
- Durante o tempo em que as amostras são trabalhadas deve ser feita uma amostragem aerobiológica do laboratório, colocando uma lâmina de microscópio revestida com uma camada fina de silicone. Isto permite obter uma aproximação do conteúdo polínico que existe no ar e da possível contaminação que possa ocorrer.

As amostras recolhidas podem ser submetidas a diferentes tratamentos físicos e/ou químicos dependendo do tipo de material e local de amostragem. Esta diversidade de tratamentos a aplicar à amostra deve-se à diversidade de material exógeno que esta pode apresentar. A presença de material exógeno varia em função dos locais de amostragem, condições a que o indivíduo esteve sujeito antes e durante a amostragem. Deste modo não é possível estabelecer um procedimento padrão a aplicar a todas as amostras.

A tomada de decisão sobre quais os tratamentos mais apropriados a submeter a amostra fazem-se com base na observação do sedimento ao longo de todo o tratamento. Através da observação do sedimento é possível identificar diferentes estratos e identificar o tipo de materiais neles presentes e desse modo optar pelo tratamento mais adequado. A figura 3.5 demonstra os procedimentos a seguir em função dos materiais observados na amostra.

Neste trabalho as amostras foram submetidas aos seguintes tratamentos físicos e químicos:

1. Desfloculação e dissolução dos ácidos húmicos pela adição de KOH a 10% e posterior aquecimento em Banho-Maria durante 10 min. [22].
2. Filtração com malha de 200  $\mu\text{m}$  (Nedfilter 18236 20093660), para remover as partículas de granulometria superior. Os grãos de pólen apresentam tamanhos iguais ou inferiores a 200  $\mu\text{m}$ , deste modo não há perda de material polínico fundamental à análise palinológica [42].

3. Solução de Pirofosfato de Sódio 0.1 M é utilizada nos casos da amostra conter solo e permite a remoção das partículas argilosas. Esta solução é adicionada à amostra e aquecida. Se necessário este passo pode ser repetido [49].
4. Remoção das partículas de sílica, no caso de a amostra ser rica em carbonatos deve fazer-se um tratamento com HCl a 20%, pois provocam uma forte reação no tratamento de remoção da sílica [49]. Após este pré-tratamento adiciona-se ácido fluorídrico 40% durante 1 a 2 dias agitando ocasionalmente. Este tratamento deve ser realizado com cuidado devido ao HF ser extremamente perigoso e corrosivo, usando tubos de plástico pois o HF ataca o vidro [22].
5. Solubilização da sílica coloidal e dos fluoretos resultantes da reação anterior por adição de ácido clorídrico a 20% 10 min. a 70°C. Após este processo deve ser realizada uma lavagem com água destilada e o sedimento deve ser transferido para tubos de vidro [22].
6. Acetólise tem como função remover a celulose e o conteúdo citoplasmático do pólen facilitando a posterior observação microscópica pois ela realça as características da exina. Devido à reatividade da solução acetolisante com a água, a amostra deve ser previamente desidratada com recurso à adição de ácido acético glacial [49]. A mistura acetolisante é preparada com Anidrido Acético e Ácido Sulfúrico numa proporção de 9:1. O volume de solução acetolisante é preparado em função dos tubos a submeter a este tratamento e tendo em conta que a cada tubo devem ser adicionados aproximadamente 5 mL da mesma [22]. Após a adição da mistura acetolisante os tubos são levados a banho-maria durante 3 minutos. É importante não ultrapassar este período de tempo pois este processo pode provocar a destruição do pólen. Para finalizar a amostra deve ser novamente lavada com ácido acético glacial, centrifugada e decantada. Para preparar o sedimento para a coloração este deve ser lavado com água destilada [49].
7. Coloração serve para aumentar o contraste das características da exina e assim facilitar a observação ao microscópio. Para tal adiciona-se uma gota de solução de fucsina básica em glicerina e deixa-se repousar o sedimento por alguns minutos [22]. Após a adição do corante os tubos são preenchidos com Glicerina 30% e levados a centrifugar durante 20 minutos a uma velocidade de 2700 r.p.m.. Terminada a centrifugação procede-se à decantação do líquido e os tubos são colocados na forma invertida durante um dia, aproximadamente, permitindo assim a secagem do sedimento. Aquando a decantação se houver levantamento do sedimento a centrifugação deve ser repetida.
8. Montagem da preparação microscópica de modo a permitir a observação microscópica e análise palinológica [22].

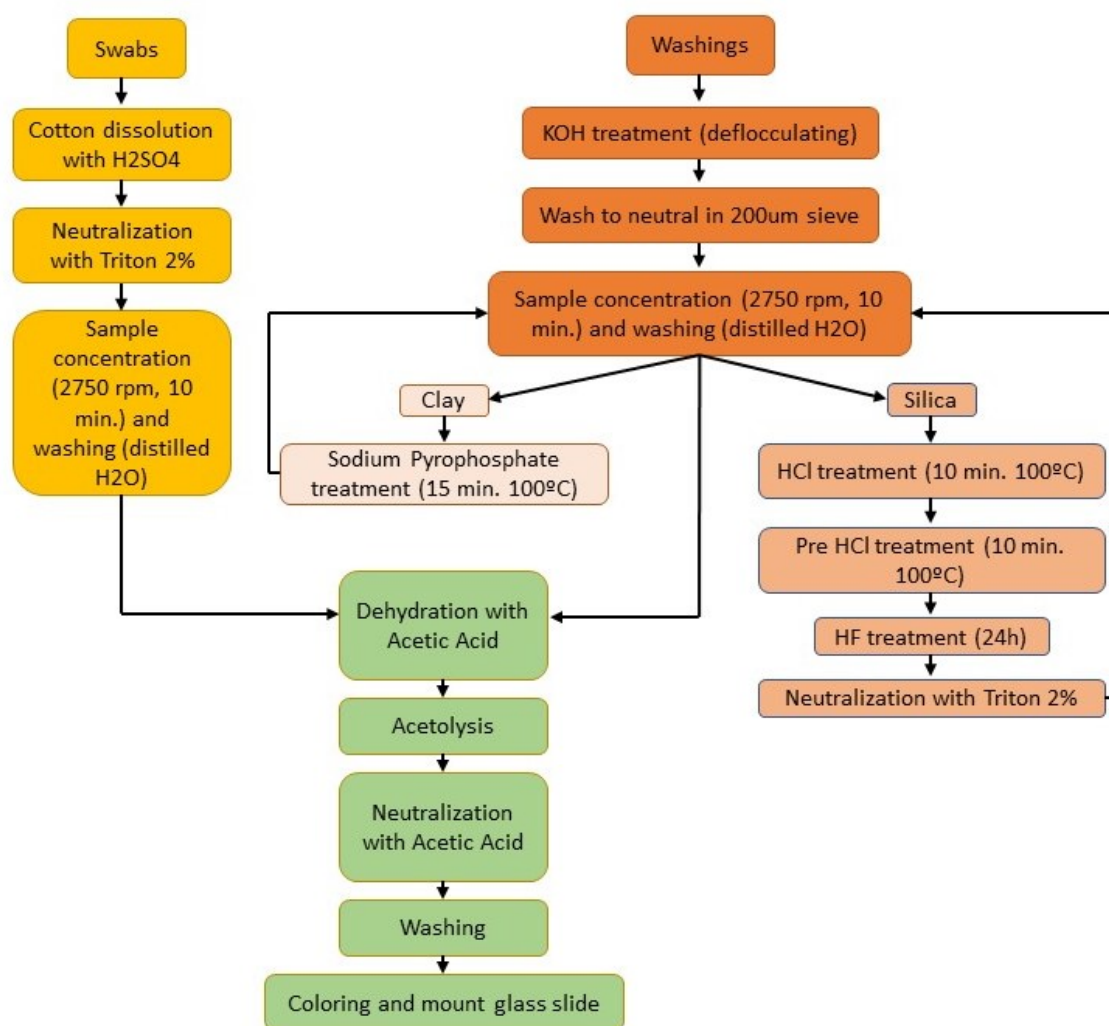


Figura 3.5: Representação esquemática dos tratamentos aplicáveis durante a análise palinológica.

### 3.2.1 Lavados do Cabelo

Da amostragem do cabelo resultou uma elevada quantidade de líquido sem interesse na análise palinológica, assim, de modo a descartar todo o excedente desnecessário realizou-se a precipitação do sedimento. Essa precipitação pode ser feita por recurso a dois métodos: (i) a precipitação natural do sedimento, resultante da força gravítica. Porém para que esta sedimentação ocorra é necessário que decorra um longo período de tempo; (ii) precipitação mecânica do sedimento, que é conseguida pelo aumento da força G através do aumento das rotações por minuto em ciclos de centrifugação, este aumento permite a precipitação dos sedimentos presentes no fluido. Neste trabalho recorreremos à sedimentação mecânica, para reduzir o tempo até ao tratamento desta amostra e evitar a perda de sedimento, através



de vários ciclos de centrifugação de 10 minutos com rotações na ordem das 2750 rotações por minuto.

Terminada a concentração do sedimento, a amostra encontra-se preparada para ser submetida aos tratamentos químicos de concentração do conteúdo polínico. Em casos de indivíduos vivos, o cabelo não apresenta matéria mineral, de modo que não é necessária a sua destruição. Uma vez que podem ser encontrados cabelos na amostra esta deve ser filtrada e de seguida prosseguiu-se a partir da acetólise.

### 3.2.2 Cavidades Nasais

Uma vez que a amostragem das cavidades nasais é efetuada através de zaragatoas é necessário iniciar o tratamento laboratorial com a destruição das mesmas. Assim, para dissolver o algodão das zaragatoas, elas foram colocadas num gobelé com  $H_2SO_4$  (99%) ficando em repouso durante 30 minutos. Este processo foi realizado com o gobelé colocado num tabuleiro com água fria, pois a dissolução das zaragatoas no ácido origina uma reação exotérmica (figura 3.6). Foi, também, observável a ocorrência de uma ligeira efervescência devido à humidade das zaragatoas. Dado que as amostras das cavidades nasais não apresentam matéria mineral, o tratamento laboratorial aplicado iniciou-se a partir da acetólise.



Figura 3.6: Processo de destruição das zaragatoas em  $H_2SO_4$

### 3.2.3 Tecido Subungueal

As amostras de tecido subungueal podem apresentar conteúdo mineral, que tem de ser eliminado. Porém, existem casos onde o conteúdo mineral se encontra ausente destas

amostras, podendo, logo após a colheita, dar-se início ao tratamento laboratorial a partir da acetólise

### 3.2.4 Solo dos Sapatos

Nas amostras resultantes da raspagem e lavagem da sola dos sapatos foi sempre obtido um resíduo rico em matéria mineral. Nestes casos foi necessário efetuar a destruição do conteúdo mineral e concentração do resíduo polínico. Assim, foram aplicados os tratamentos laboratoriais tendo por objetivo a defloculação e dissolução de ácidos húmicos, filtração com malha de 200  $\mu m$  como demonstrado na figura 3.7. Foram também aplicados os respetivos tratamentos (apresentados anteriormente na figura 3.5) para destruir a matéria argilosa, os carbonatos e a sílica que podiam estar na amostra. A acetólise é aplicada uma vez que a matéria mineral se encontrava destruída.



Figura 3.7: Filtração das amostras de solo com recurso a malha de 200  $\mu m$

## 3.3 Análise das Amostras

Uma vez concentrado o resíduo rico em palinomorfos, este só tem interesse se observado através de microscopia, e com esta observação forem identificados e contabilizados os palinomorfos presentes nesse resíduo. Para tal é necessário transferir esse sedimento para preparações microscópicas.

### 3.3.1 Montagem das preparações

A análise das amostras inicia-se com a secagem do resíduo polínico resultante dos tratamentos químicos. Essa secagem é conseguida pela inversão dos tubos de vidro (figura 3.8), após decantação do sobrenadante, durante aproximadamente 12h. Com este processo a água contida no resíduo polínico evapora, podendo permanecer uma pequena porção em

estado líquido nas bordas dos tubos, que passadas as 12h deve ser removida com o auxílio de papel absorvente. Tendo o sedimento seco este é ressuspensão com 200  $\mu\text{l}$  de glicerina fenolada (glicerina 80% e 1% de fenol) e agitada com a utilização de um vortex. Após a solução se encontrar homogênea ela é aspirada com uma micropipeta e transferida para tubos plásticos permitindo assim o seu armazenamento.

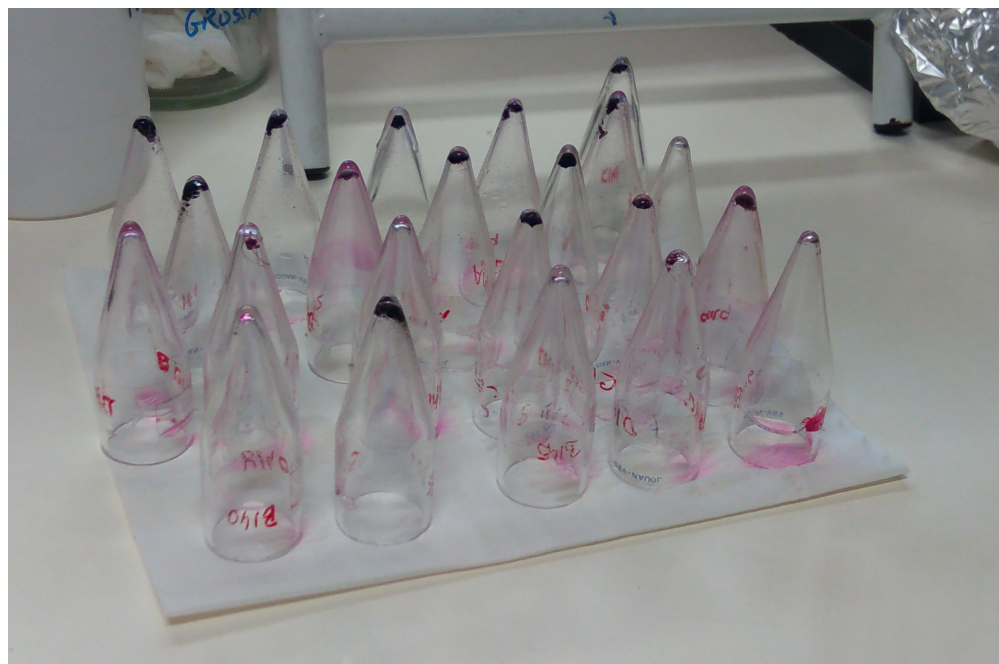


Figura 3.8: Processo de secagem do sedimento através da inversão dos tubos e repouso durante um dia.

Para observação microscópica é necessário montar as preparações, neste trabalho foram montadas preparações extemporâneas, que permitem a criação de uma câmara entre a lamela e a lâmina possibilitando a mobilidade dos grãos de pólen. Esta mobilidade é de especial interesse na identificação do pólen, pois permite ao palinólogo em caso de dúvidas ver outras perspectivas do grão e esclarecer as dúvidas que possam existir na identificação.

Esta câmara é possível através da realização de dois traços, nas extremidades de maiores dimensões da lamela (22x50mm), com cola histolaque. Esta aplicação da cola vai conferir relevo à lamela para assim ser possível criar a câmara. Estes traços são realizados com recurso a uma régua e uma ponta de micro-pipeta cortada diagonalmente. Na execução do traço, a ponta da micro-pipeta não deve ser arrastada com demasiada velocidade pois desse modo não é criado o relevo desejado e não devem haver interrupções na realização do traço. Esta preparação das lamelas deve ser um trabalho prévio à montagem, para que decorra o tempo necessário à secagem da cola (figura 3.9).



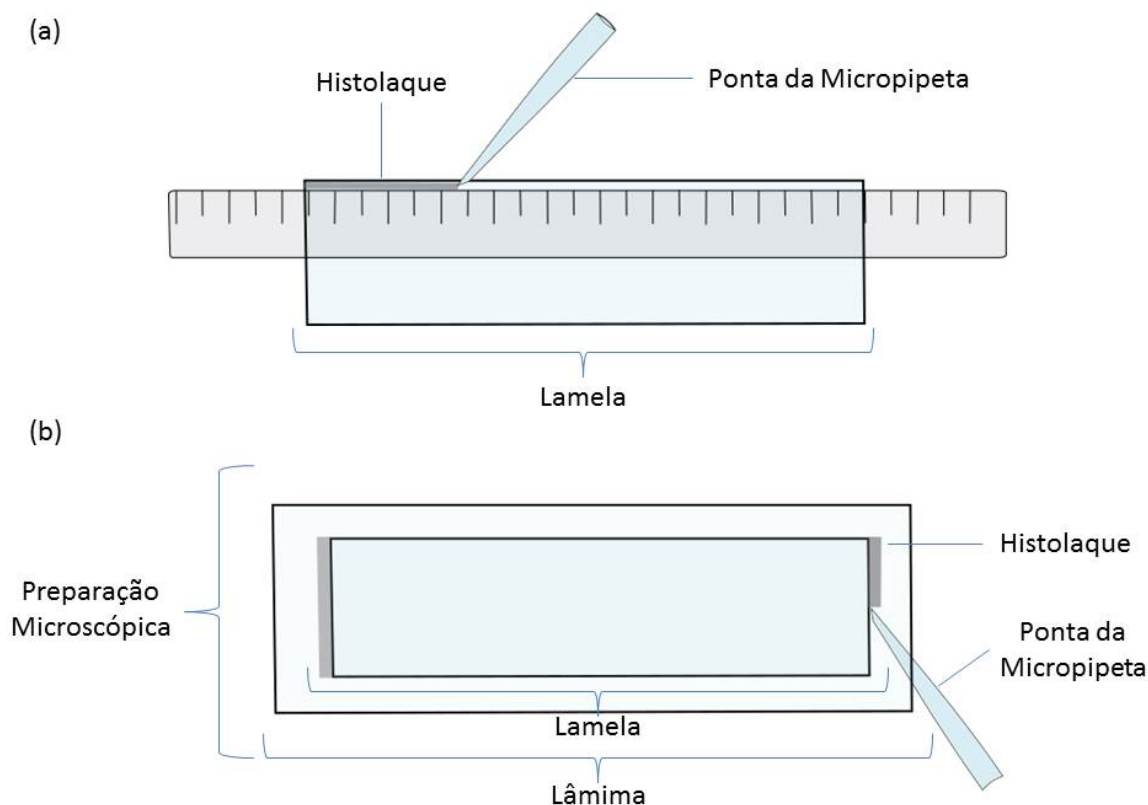


Figura 3.9: Montagem das preparações microscópicas: (a) realização de traços de histolaque na lamela e (b) selagem da lamela após conclusão da montagem da preparação.

No momento da montagem da preparação as amostras são homogeneizadas, seguidamente são pipetados  $50 \mu\text{l}$  da solução e colocados no centro da lâmina ( $76 \times 26 \text{ mm}$ ). De seguida é aplicada uma nova camada de cola sobre os traços previamente realizados na lamela. Esta nova camada serve para conferir mais uma camada de relevo e para permitir colar a lamela na lâmina da preparação. Aplicada a cola é colocada a lamela sobre a lâmina espalhando assim a amostra por toda a área da lamela e colando esta à lâmina. Terminada a colagem, com recurso à ponta da micro-pipeta e histolaque, a lamela é selada nas bordas de menor tamanho e que não tinham sido expostas à cola, como observável na figura 3.9 (b).

### 3.3.2 Esporos de *Lycopodium*

A determinação da concentração dos palinórfos presentes numa amostra é fundamental na análise palinológica, podendo esta concentração ser obtida de diferentes formas. Stockmarr descreveu um método onde se recorre à adição de uma quantidade conhecida de um marcador exótico. O marcador utilizado mais comumente são os esporos de *Lycopodium clavatum*. Um outro método utilizado para determinar a concentração de palinórfos

é o método volumétrico, porém neste trabalho foi usado o método do marcador exótico. A concentração dos palinomorfos foi calculada seguindo a equação de Benninghoff, equação (3.1) [50].

$$C = \frac{\frac{PólenContado}{EsporosContados} \times EsporosPorPastilha}{PesoDaAmostra} \quad (3.1)$$

Neste trabalho foram utilizadas pastilhas produzidas pelo Departamento de Geologia Quaternária da Universidade de Lund, na Suécia. Cada pastilha apresenta uma concentração de 9666 esporos, com um desvio padrão de 6,64%. As pastilhas foram adicionadas às amostras durante o tratamento laboratorial, sendo dissolvidas em HCl.

Para a aplicação da fórmula de cálculo da concentração dos palinomorfos as amostras foram pesadas, secas, antes do início do tratamento laboratorial.

### 3.3.3 Contagem e Identificação dos Palinomorfos

A contagem e identificação dos palinomorfos foi realizada pela observação das preparações em microscopia ótica (Leica 020-518.500 DM/LS) com uma ampliação de 400x. A identificação do conteúdo polínico foi feita com base nos aspetos morfológicos e estruturais dos mesmos e com recurso a atlas da região de onde provinham as amostras.

Para as amostras dos tecidos biológicos (cabelo, tecido subungueal e cavidades nasais), a contagem foi feita através do varrimento na vertical ao longo de toda a área da lâmina, sendo identificados e contados todos os palinomorfos, bem como os esporos de *Lycopodium* adicionados durante o tratamento.

Nas amostras do solo de sapatos, devido à elevada quantidade de pólen e material exógeno que dificulta a observação a contagem foi realizada em 10 linhas horizontais equidistantes. Para este método de contagem é necessário efetuar o cálculo da área da preparação que apenas apresenta pólen. Calculada a área é possível o cálculo de pontos equidistantes da preparação, nos quais é colocada a objetiva e feito um varrimento horizontal ao longo de toda a linha. Neste método são também identificados e contados todos os palinomorfos, bem como os esporos.

## 3.4 Análise Estatística

Neste trabalho foi, ainda, realizada uma análise hierárquica de cluster para verificar se era possível obter a discriminação entre: (i) diferentes tecidos amostrados, (ii) diferentes intervalos temporais e (iii) diferentes locais de amostragem, usando os métodos anteriormente apresentados. A análise hierárquica de cluster foi realizada para os valores de concentração, padronizados, dos diferentes tipos polínicos, e o número de clusters foi determinado usando: (i) o quadrado da distância Euclidiana como distância de média e (ii) o método de Ward como método de associação. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo uso do software SPSS (24.0).

## Capítulo 4

# Análise Palinológica Forense

*A análise palinológica fornece as concentrações de pólen por grama de amostra, permitindo a constituição de um perfil polínico para cada amostra. A análise e interpretação dos resultados atribui-lhe o interesse forense.*

*Neste capítulo são apresentados os resultados da análise palinológica aplicada a amostras de cabelo, cavidades nasais, tecido subungueal e solo de sapatos.*

*Este capítulo inicia-se com a análise da eficiência dos diferentes tipos de materiais estudados como armadilha polínica em diferentes momentos de amostragem. A relação entre a eficiência dos tecidos e suas características como comprimento ou rugosidade é também analisada. Foi ainda realizado um estudo isolado em 10 indivíduos, sujeitos às mesmas condições, para estudar a capacidade do pólen como elemento reconstrutivo de local e temporal.*

## 4.1 Descrição Palinológica

Neste trabalho foram identificados e contabilizados os diferentes tipos polínicos presentes nas diferentes amostras recolhidas no inverno e na primavera. Os dados sobre a presença ou ausência dos diferentes tipos polínicos para cada tecido encontram-se representados na tabela 4.1.

Os tipos polínicos encontrados diferem entre os materiais amostrados. Foi observado que as amostras de cabelo apresentam maior diversidade de pólen quando comparadas com os restantes tecidos biológicos, sendo os tipos polínicos encontrados neste tecido essencialmente anemófilos e originários de plantas em floração no momento da amostragem. As amostras do tecido subungueal apresentam menor diversidade polínica, contendo por vezes tipos polínicos que estão presentes no ar em outras estações do ano não correspondentes ao momento da amostragem. No entanto, estes tipos polínicos foram observados nas amostras de solo dos sapatos correspondentes, podendo indicar a transferência e aprisionamento de material polínico aquando o contacto das mãos com o solo.

As amostras de solo apresentaram a maior diversidade de tipos polínicos comparativamente aos tecidos biológicos, justificado pelo solo funcionar como armazém de palinóforos. Também, os tipos polínicos encontrados não se correlacionaram com a estação do ano em que foi realizada a amostragem.

Relativamente aos diferentes momentos de amostragem, foi observada nos tecidos biológicos, maior diversidade polínica nas amostras recolhidas durante a primavera, facto que poderá estar relacionado com esta estação coincidir com os períodos de floração da maior parte das plantas cujos tipos polínicos foram identificados neste estudo.

Na figura 4.1, estão apresentadas as frequências dos tipos polínicos dominantes identificados nos diferentes tipos de material amostrado. Para esta representação foram excluídos os tipos polínicos cuja sua frequência era igual ou inferior a 2%.

É notória a diferença dos tipos polínicos dominantes encontrados nas amostras de inverno (figura 4.1 (a)), comparativamente às amostras de primavera (figura 4.1 (b)), demonstrando assim a capacidade da análise palinológica na discriminação temporal. Assim, nas amostras recolhidas durante o inverno, foi observada a dominância dos seguintes tipos polínicos: *Fraxinus*, *Myrtaceae* e *Pinaceae*.

*Fraxinus* e a *Myrtaceae* são tipos polínicos cuja presença na atmosfera é observada durante os meses de inverno; em contrapartida, o pólen de *Pinaceae* é um pólen anemófilo extremamente aerodinâmico que é facilmente ressuspenso e transportado pelo vento. Nas amostras de cabelo foram ainda observados, em menor quantidade, outros tipos polínicos tipicamente presentes no inverno, como é o caso do *Alnus* e do *Corylus*. No tecido subungueal foi, ainda, observada uma frequência representativa de pólen *Chenopodiaceae*, que pode ser explicada pelo contacto das mãos com plantas pertencentes a esta família botânica.

Relativamente às amostras de solo dos sapatos foi observada que mais de metade do pólen identificado pertencia a *Myrtaceae* e que esta família apresenta o seu período de floração no intervalo temporal em que foram efetuadas as amostragens. Porém, foram ainda identificados vários tipos polínicos cujo momento de floração não é coincidente com o momento de amostragem, o que pode ser explicado pela deposição e armazenamento desse pólen no solo por longos períodos de tempo.

Tabela 4.1: Representação dos tipos polínicos contabilizados para: A - cavidades nasais, B - tecido subungueal, C - solo dos sapatos e D - cabelo, para os diferentes momentos de amostragem (Inverno e Primavera). + Corresponde à observação do tipo polínico, 0 corresponde à não observação.

	Inverno				Primavera			
	A	B	C	D	A	B	C	D
<i>Acacia</i>	0	0	+	+	0	+	+	+
<i>Acer</i>	0	0	+	0	0	0	+	0
<i>Alnus</i>	0	+	+	+	+	+	+	+
<i>Amaryllidaceae</i>	0	+	+	+	0	0	+	0
<i>Apiaceae</i>	0	0	+	0	+	+	+	+
<i>Artemisia</i>	0	0	+	0	0	0	+	+
<i>Asteraceae</i>	0	+	+	+	0	+	+	+
<i>Bignoniaceae</i>	0	0	0	+	0	0	0	0
<i>Betula</i>	0	0	+	0	+	+	+	+
<i>Brassicaceae</i>	0	0	+	0	0	+	+	+
<i>Cariophylla</i>	0	0	+	0	+	+	+	+
<i>Castanea</i>	0	0	+	0	0	0	+	0
<i>Chenhopodiaceae</i>	0	+	+	+	+	+	+	+
<i>Crorylus</i>	0	+	+	+	0	0	0	0
<i>Cupressus</i>	0	+	+	+	0	0	+	0
<i>Eqchium</i>	0	0	+	0	0	0	+	0
<i>Ericaceae</i>	0	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fraxinus</i>	0	+	+	+	0	0	+	0
<i>Juglans</i>	0	0	+	0	+	+	+	+
<i>Lameaceae</i>	0	+	+	+	0	0	+	0
<i>Laurus</i>	0	0	+	0	0	0	0	0
<i>Ligustrum</i>	0	0	+	0	0	0	+	0
<i>Liquidambar</i>	0	0	+	0	0	0	+	0
<i>Myrtaceae</i>	0	+	+	+	+	+	+	+
<i>Oleaceae</i>	0	0	+	0	+	+	+	+
<i>Pinaceae</i>	0	+	+	+	+	+	+	+
<i>Plantago</i>	0	+	+	0	+	+	+	+
<i>Platanus</i>	0	0	+	0	+	+	+	+
<i>Poaceae</i>	0	+	+	+	+	+	+	+
<i>Quercus</i>	0	+	+	0	+	+	+	+
<i>Rosaceae</i>	0	0	+	0	0	0	0	0
<i>Rumex</i>	0	+	+	+	+	+	+	+
<i>Tilia</i>	0	0	+	0	0	0	+	0
<i>Urticaceae</i>	0	0	+	0	+	+	+	+

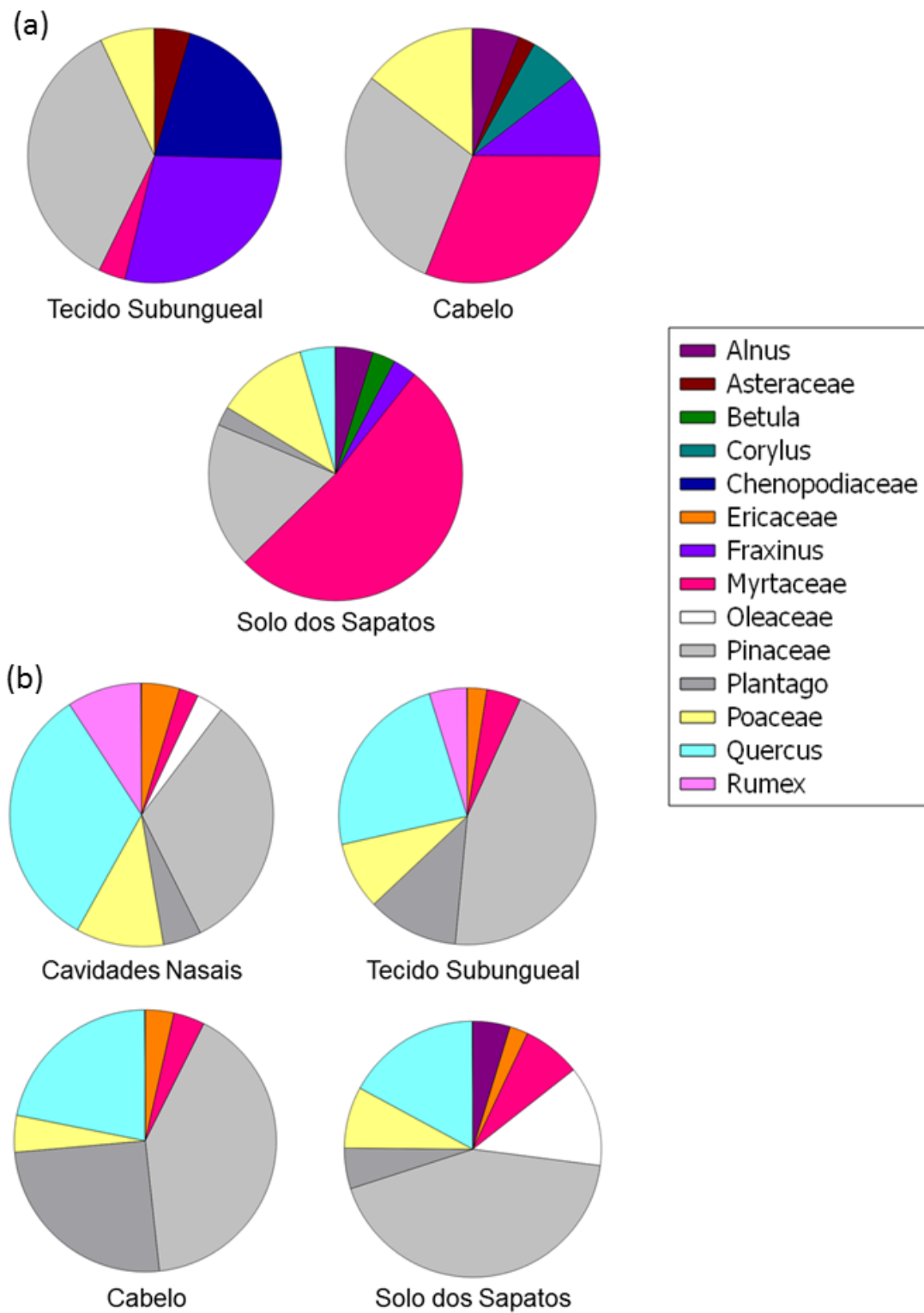


Figura 4.1: Gráfico circular dos tipos polínicos dominantes nos diferentes tipos de material amostrado para: (a) inverno e (b) primavera.

Nas amostras de primavera (figura 4.1 (b)) foi observada uma dominância de tipos polínicos como *Pinaceae*, *Quercus* e no caso do cabelo *Plantago*. Estes tipos polínicos apresentam floração na primavera, e uma vez que são do tipo anemófilo, são transportados pelo vento depositando-se facilmente nas superfícies e aprisionados pelos tecidos biológicos. Nestes tecidos foram também identificados outros tipos polínicos como por exemplo *Poaceae*, *Oleaceae* e *Rumex*, porém com menor representatividade. Nas amostras de solo foram observados tipos polínicos característicos da estação do ano anterior como é o caso do *Alnus*.

## 4.2 Tecidos Biológicos como Armadilha Natural de Pólen

Neste trabalho fez-se um estudo palinológico em amostras de tecidos biológicos e solo dos sapatos retirados de 20 voluntários humanos em duas estações do ano distintas (num total de 40 indivíduos): inverno (Dezembro e Janeiro) e primavera (Março, Abril e Maio). Foram ainda amostrados 10 voluntários humanos no dia 5 de Fevereiro de 2017 que permaneceram durante três dias no mesmo local em Arcos de Valdevez, para avaliação do perfil polínico como ferramenta de reconstrução espacial e temporal.

Foi analisada a distribuição do peso inicial da amostra (antes de ser submetida a qualquer tipo de tratamento laboratorial) para os diferentes tipos de material amostrado (figura 4.2).

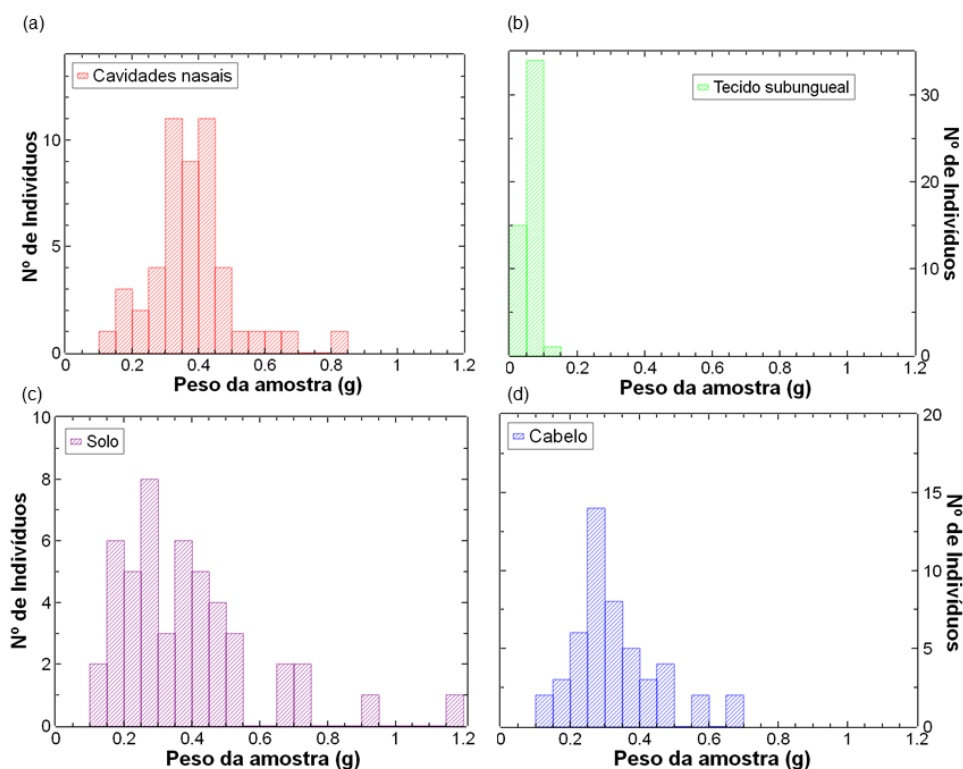


Figura 4.2: Distribuição do peso inicial da amostra presente em: (a) cavidades nasais, (b) tecido subungueal, (c) solo presente no calçado e (d) cabelo.

Foi observado que o peso mínimo de amostra foi de 0,02 gramas (tecido subungueal) e o peso máximo de 1,20 gramas (solo dos sapatos), tendo sido obtido conteúdo polínico para todas as gamas de peso representadas.

Relativamente ao tecido subungueal, a maioria das amostras apresentava peso inferior a 0,1 gramas, demonstrando a capacidade de obtenção de resultados através de análise palinológica para pesos reduzidos. Para os restantes materiais amostrados é possível observar uma distribuição tendencialmente normal, sendo que o peso da maioria das amostras variaram entre os 2 e os 0,5 gramas. Para as amostras das cavidades nasais é importante referir que o peso inicial inclui a matéria resultante da dissolução da zaragatoa. Com estes resultados é possível afirmar que mesmo quando os materiais se encontram aparentemente limpos a sua amostragem poderá ser realizada, uma vez que apenas é necessária uma amostra entre 0,01 a 0,05 gramas para aplicar com sucesso a análise palinológica forense.

Foi analisada a concentração total de pólen (número de pólen por grama de amostra) presente nas cavidades nasais, tecido subungueal, solo presente no calçado, e cabelo, tendo sido comparados os resultados dos diferentes indivíduos nas duas estações do ano.

Na figura 4.3 (a) é possível observar os resultados obtidos na amostragem efetuada durante o inverno. Observou-se a ausência de pólen nas amostras das cavidades nasais mas a presença de pólen nos restantes tecidos amostrados no mesmo período. Neste caso a ausência de pólen nas cavidades nasais durante o inverno pode estar relacionada com a reduzida quantidade de pólen presente na atmosfera [51, 52, 53]. No caso de amostras recolhidas em cadáveres, para uma amostragem mais eficiente, é possível implementar a técnica descrita por Wiltshire et al. [34] onde se procede à remoção do cérebro e à perfuração das placas cribiformes, por forma a permitir a completa lavagem das cavidades nasais; uma vez que a passagem da zaragatoa é bloqueada pelas coanas; desta forma uma grande parte da cavidade nasal não é amostrada. O tecido subungueal apresentou maior eficiência no aprisionamento de pólen quando comparado com as amostras de cabelo. A maior eficiência do tecido subungueal como armadilha polínica no inverno pode ser explicada pela reduzida concentração de pólen atmosférico que mais facilmente seria aprisionado no cabelo. Em contrapartida, as superfícies com as quais as nossas mãos entram em contacto diariamente podem funcionar como depósito de pólen de períodos de floração anteriores, aumentando assim a quantidade de pólen disponível para transferência. Além disso, dado que os indivíduos estão cronologicamente representados no gráfico, é observável, nos indivíduos 18, 19 e 20, uma maior concentração de pólen nas amostras de cabelo; o que pode ser explicado pela presença de pólen na atmosfera resultante de plantas em floração no final do mês de Janeiro.

Na figura 4.3 (b) está representada a concentração total de pólen nas cavidades nasais, tecido subungueal e cabelo dos indivíduos amostrados na primavera. É possível observar que todos os tecidos biológicos amostrados apresentam conteúdo polínico, ao contrário do observado nos indivíduos amostrados no inverno onde as amostras das cavidades nasais não apresentam qualquer tipo de pólen. Neste caso, as amostras das cavidades nasais apresentam conteúdo polínico dado ao aumento de espécies em floração na primavera, que levam ao aumento do pólen atmosférico. No entanto, este tecido apresenta uma menor concentração de entre os tecidos amostrados. Neste caso, é observável que a concentração total de pólen nas amostras de tecido subungueal não varia quando comparada às amostras recolhidas no inverno; em contraste, a concentração total de pólen presente no cabelo é superior para as amostras colhidas na primavera quando comparada com os resultados



das amostras recolhidas no inverno. Nestes meses, os valores de concentração de pólen mantêm-se baixos, com concentração em torno dos 5000 grãos de pólen por grama de amostra enquanto que para a primavera a concentração máxima é superior a 20000 grãos de pólen por grama de amostra. Tal como acontece no caso das cavidades nasais, a maior presença de pólen atmosférico justifica o aumento da concentração total de pólen neste tecido.

No caso do solo, as concentrações totais de pólen obtidas para os indivíduos amostrados no inverno e primavera estão apresentados na figura 4.3 (c) e (d). Daqui é possível retirar que a concentração de conteúdo polínico nas amostras recolhidas na primavera é superior à concentração nas amostras recolhidas no inverno, tal como aconteceu na amostragem efetuada nos tecidos biológicos. No entanto a concentração de pólen encontrada nas amostras de solo é superior ao quantificado nas amostras de tecido biológico. Isto deve-se ao facto de o solo funcionar como um reservatório de pólen, que dada a sua resistência física e química, permanece por longos períodos sem sofrer degradação.

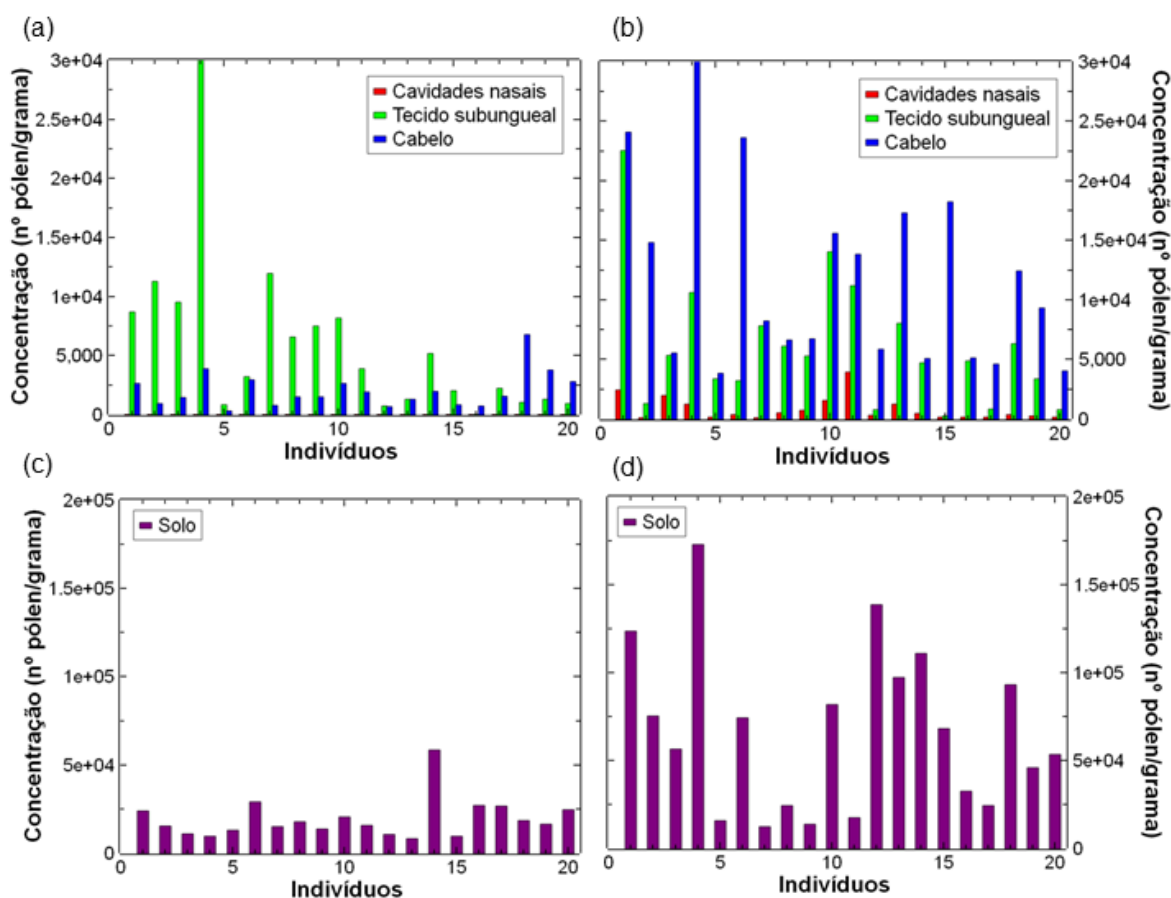


Figura 4.3: Concentração total de pólen (nº pólen/grama) em função dos indivíduos amostrados para: (a) tecidos biológicos amostrados no inverno, (b) tecidos biológicos amostrados na primavera, (c) solo presente nos sapatos amostrados no inverno e (d) solo presente nos sapatos amostrados na primavera.

Foi analisada a evolução ao longo do tempo da concentração total de pólen, para os diferentes tecidos, para todos os indivíduos em estudo, (figura 4.4). É observável o aumento da concentração total de pólen em função da evolução temporal, à exceção do tecido subungueal, onde se observa uma distribuição relativamente homogênea da concentração em função da época de amostragem, não havendo uma variação quantitativa entre amostras colhidas no inverno e na primavera. O aumento da concentração de pólen nas amostras em função do tempo pode dever-se ao facto de na primavera haver um maior número de espécies em floração, que levam ao aumento da concentração de pólen atmosférico, aumentando assim o aprisionamento de pólen pelos tecidos e solo.

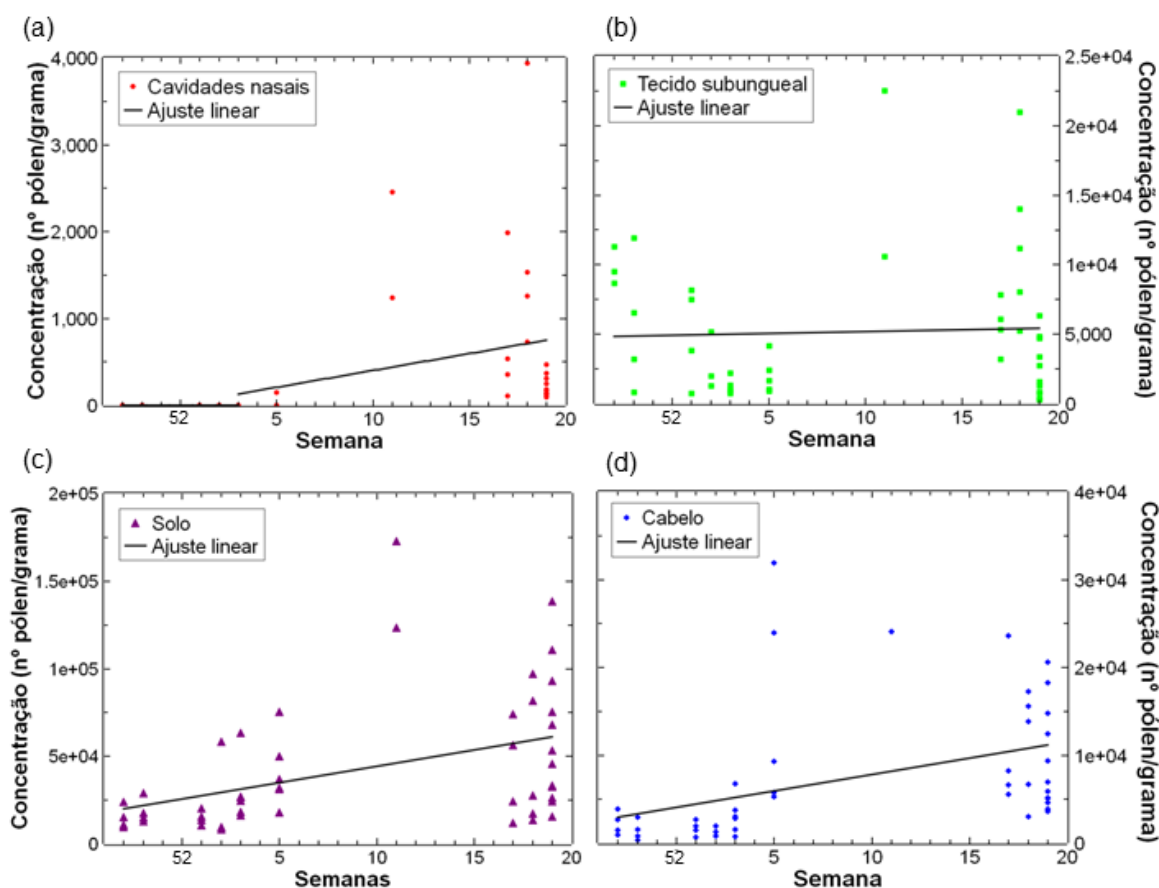


Figura 4.4: Evolução temporal da concentração total de pólen (nº pólen/grama) presente em: (a) cavidades nasais, (b) tecido subungueal, (c) solo presente no calçado e (d) cabelo. Ajustes lineares aos dados experimentais são apresentados para cada tipo de tecido.

Foram ainda analisados parâmetros como o peso inicial da amostra e a concentração total de pólen em função do comprimento das unhas e do cabelo. Na figura 4.5 (a) e (b) são apresentados os resultados para o peso inicial da amostra e concentração total de pólen em função do comprimento das unhas. Para estas amostras não foi observada uma relação significativa do peso inicial da amostra e da concentração total de pólen em função do comprimento do tecido. Perante isto é possível concluir que o comprimento das unhas não

influencia a capacidade do tecido subungueal na retenção de pólen, podendo a eficiência de aprisionamento deste tecido ser apenas influenciada por outros fatores, como é o caso das atividades praticadas pelos indivíduos antes da amostragem, frequência de lavagem das mãos, e higienização das unhas.

Nas amostras de cabelo, apresentadas na figura 4.5 (c), observou-se que a partir dos cabelos com menor comprimento obteve-se, tendencialmente, um peso inicial de amostra igual ou superior quando comparados com os obtidos para cabelos de maior comprimento, porém essa relação não é significativa. Isto indica que cabelos com diferentes comprimentos possuem capacidades de aprisionamento distintas. Esta diferença poderá ser devida ao diferente alinhamento que cabelos longos possuem em relação a cabelos curtos, como pode ser observado na figura 4.6. Dado que cabelos longos possuem maior peso, este tende a dominar a elasticidade do cabelo garantindo um alinhamento segundo o campo gravítico, conferindo-lhe assim a sua organização. Inversamente cabelos curtos possuem menor peso, e assim a sua elasticidade tende a dominar o peso levando a um alinhamento mais caótico. À semelhança do observado na figura 4.2 (d), é ainda visível uma ausência de relação entre o peso inicial da amostra e a evolução temporal.

Na figura 4.5 (d) é possível observar a relação entre a concentração de pólen e o comprimento do cabelo. Neste caso, a concentração de pólen neste tecido é dependente do momento do ano em que a amostragem é realizada. Nas amostras recolhidas no inverno, nomeadamente Dezembro e Janeiro, a distribuição da concentração é relativamente homogênea em função do comprimento, sendo visível que a concentração se mantém constante mesmo quando o aumento de comprimento acontece numa ordem de 10x. A partir de Fevereiro, com o aumento do número de espécies em floração, e até Maio é observável o aumento da concentração polínica no cabelo, sendo particularmente visível no caso de cabelos com menor comprimento. Deste modo, podemos afirmar que a eficiência do cabelo como armadilha polínica é afetada pelo seu comprimento, sendo que cabelos de menores dimensões são mais eficientes que os de maiores dimensões. De facto, o pólen aerobiológico possui carga elétrica [54, 55] ; dado que o cabelo possui triboeletricidade [56], existe a possibilidade de atrair ou repelir o pólen através de forças eletrostáticas [37]. Dada a diferença da eficiência de aprisionamento entre cabelos curtos e compridos é possível sugerir que forças eletrostáticas estão envolvidas. Dado o facto de o cabelo comprido possuir mais liberdade de movimento pode ocorrer que este fique carregado positiva ou negativamente relativamente à neutralidade do cabelo curto. Isto implica que, dependendo da carga do pólen, o cabelo comprido pode atrair ou repelir o pólen em suspensão. Dado que na figura 4.5 (d) se observa uma maior concentração de pólen para cabelos curtos do que para cabelos compridos na época primaveril é possível que, segundo o que foi dito anteriormente, esteja a ocorrer repulsão do pólen por parte do cabelo comprido enquanto que para o cabelo curto não existam forças eletrostáticas significativas sobre o pólen, justificando assim a diferença de eficiência de aprisionamento.

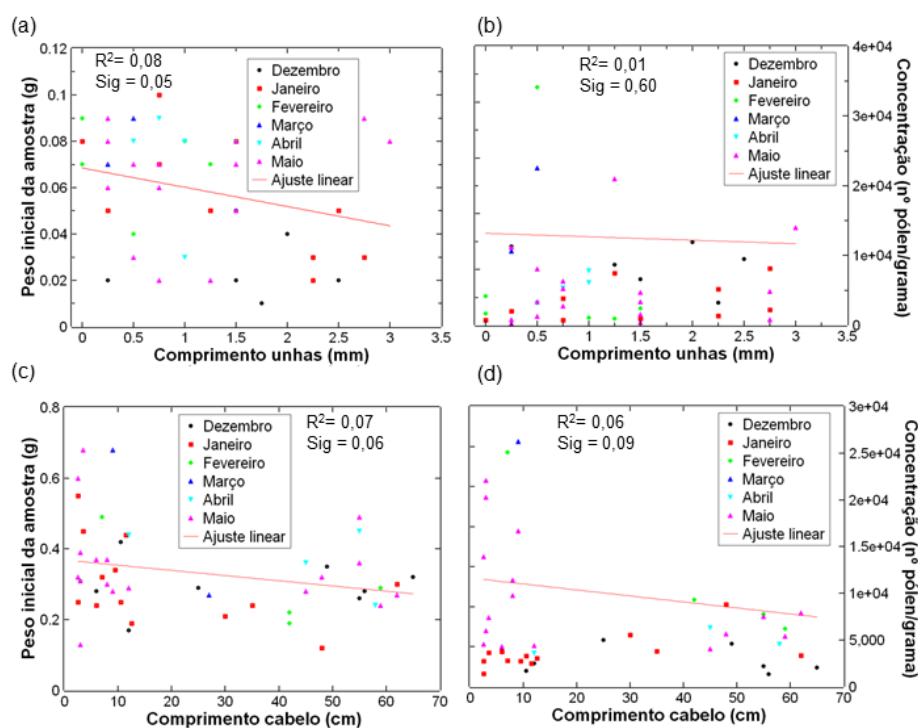


Figura 4.5: Evolução do peso inicial da amostra (g) e da concentração total de pólen (nº pólen/grama) em função do comprimento dos tecidos para: (a, b) comprimento das unhas e (c, d) comprimento do cabelo.



Figura 4.6: Fotografia ilustrativa da diferença entre alinhamentos para cabelos curtos e cabelos compridos (a)(b)

Na figura 4.7 são observados os resultados da análise do peso inicial de amostra e concentração de pólen nas amostras de solo, para diferentes tipos de sola. As solas do sapato dos diferentes indivíduos amostrados foram classificadas como: sola rugosa, sola semi-rugosa e sola lisa, como pode se observado na figura 4.7 (c). Relativamente ao peso inicial da amostra, é possível observar na figura 4.7 (a) que este é superior para amostras recolhidas em solas rugosas sendo que para solas semi-rugosas a lisas a distribuição do peso em função deste fator é semelhante, apesar de duas amostragens discrepantes obtidas nas solas semi-rugosas. Independentemente dos tipos de sola, o peso inicial da amostra é superior para meses de inverno comparativamente com os meses de primavera, esta evolução temporal do peso da amostra tinha sido já observada na figura 4.2 (c).

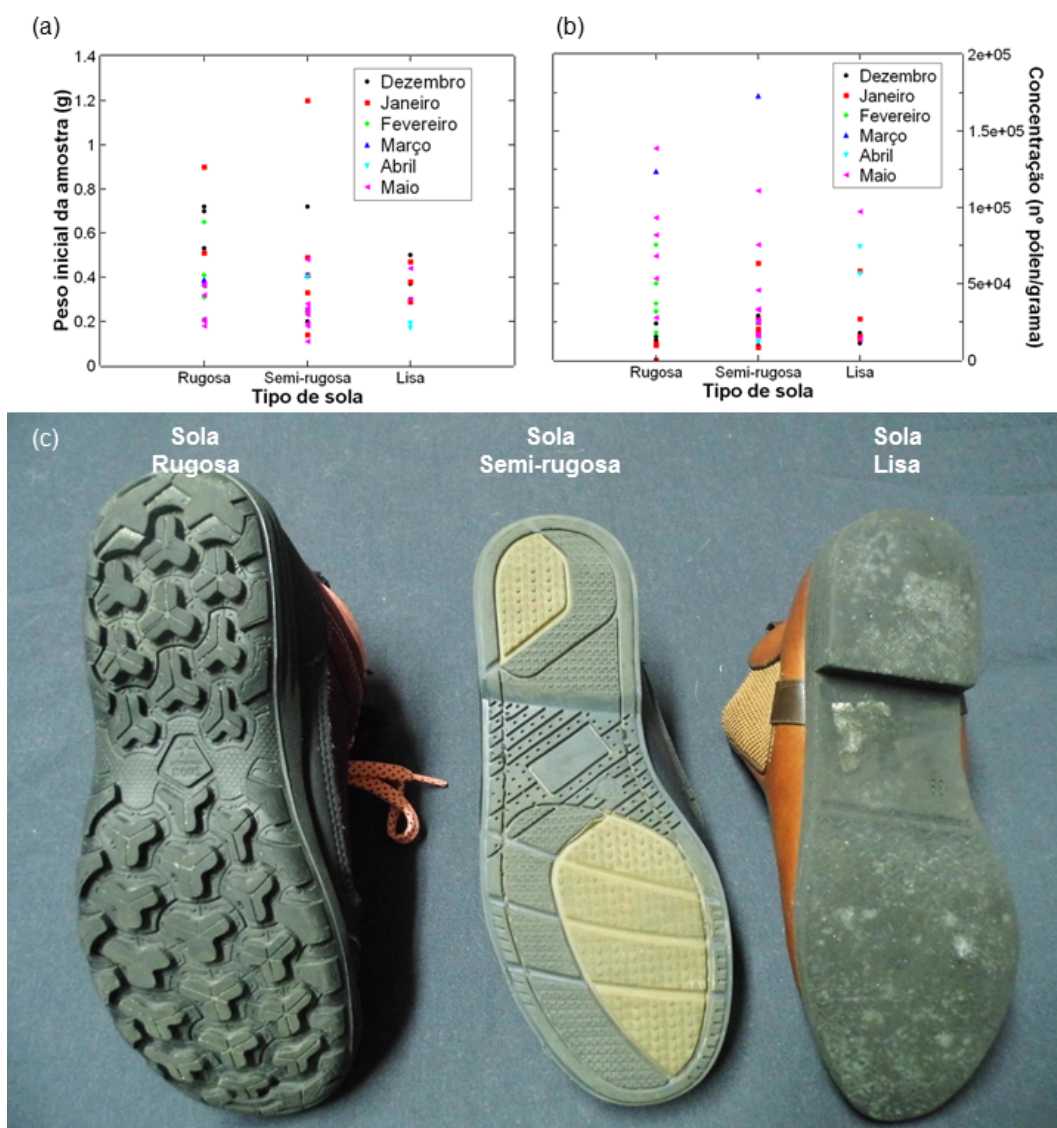


Figura 4.7: Peso inicial da amostra (a) e concentração total de pólen (b) nas amostras de solo do calçado em função do tipo de sola. (c) Diferentes tipos de sola amostrados.

Relativamente à concentração total de pólen, apresentada na figura 4.5 (b), é observável que esta é menor em solas menos rugosas. Isto deve-se possivelmente ao facto de o pólen aprisionado nas reentrâncias de solas mais rugosas se encontrar mais protegido, ficando assim retido até à amostragem, o que não ocorre no caso de solas lisas. Neste caso, e contrariamente ao que acontece para o peso inicial de amostra, a concentração de pólen é superior para amostras recolhidas em meses de primavera, como observado previamente na figura 4.4. Deste modo, podemos afirmar que o tipo de sola influencia o peso inicial de amostra, assim como a concentração total de pólen.

Com base na concentração de pólen encontrada nos diferentes indivíduos (figuras 4.8 e 4.9) foi efectuada uma análise de cluster de modo a verificar a possível existência de discriminação entre os quatro tipos de material amostrado assim como discriminação temporal. Nesta análise foi utilizada a concentração total de pólen em detrimento da frequência de cada tipo polínico por amostra, uma vez que a quantidade absoluta de pólen é um dado fundamental para a distinção de fatores como por exemplo o intervalo temporal.

Na figura 4.8 (a) é possível observar a discriminação das amostras das cavidades nasais efectuadas no inverno e na primavera, justificada pela ausência de pólen nas cavidades nasais no inverno.

Relativamente às amostras recolhidas no tecido subungueal foi possível efectuar a discriminação entre 3 clusters (figura 4.8 (b)). Os cluster A e B apresentam maior semelhança, traduzidas pela distância entre eles. No entanto o cluster B integra indivíduos amostrados unicamente na primavera e o C no inverno. Dada a proximidade do cluster A com o cluster B neste último seria expectável conter apenas indivíduos amostrados na primavera; no entanto é observada a presença de indivíduos amostrados no inverno. Isto pode dever-se à baixa concentração de conteúdo polínico neste tecido que alguns indivíduos apresentam, assim como a existência de um grupo de indivíduos amostrados (indivíduos 17 a 20) num período temporal de maior concentração polínica atmosférica, como é possível observar na figura 4.3 (a).

No caso das amostras de solo é observável uma separação evidente para os indivíduos amostrados no inverno e na primavera, sendo que os indivíduos amostrados no inverno estão fortemente correlacionados (figura 4.9 (a)). Relativamente ao cluster que contém os indivíduos amostrados na primavera verifica-se que a correlação entre eles é menor, traduzida pela maior distância entre eles, demonstrando assim uma maior diversidade qualitativa e quantitativa relativa aos tipos polínicos apresentados por cada indivíduo. Dado que não estamos perante ambientes controlados, é possível observar a existência de um grupo de indivíduos amostrados no inverno junto com os indivíduos amostrados na primavera.

Por último, na figura 4.9 (b) tal como nos casos anteriores é possível observar a perfeita separação das amostras de cabelo recolhidas em ambas as épocas do ano, sendo observada uma elevada diversidade de tipos polínicos captados por este tecido em ambas as épocas, traduzida pela maior distância entre indivíduos.

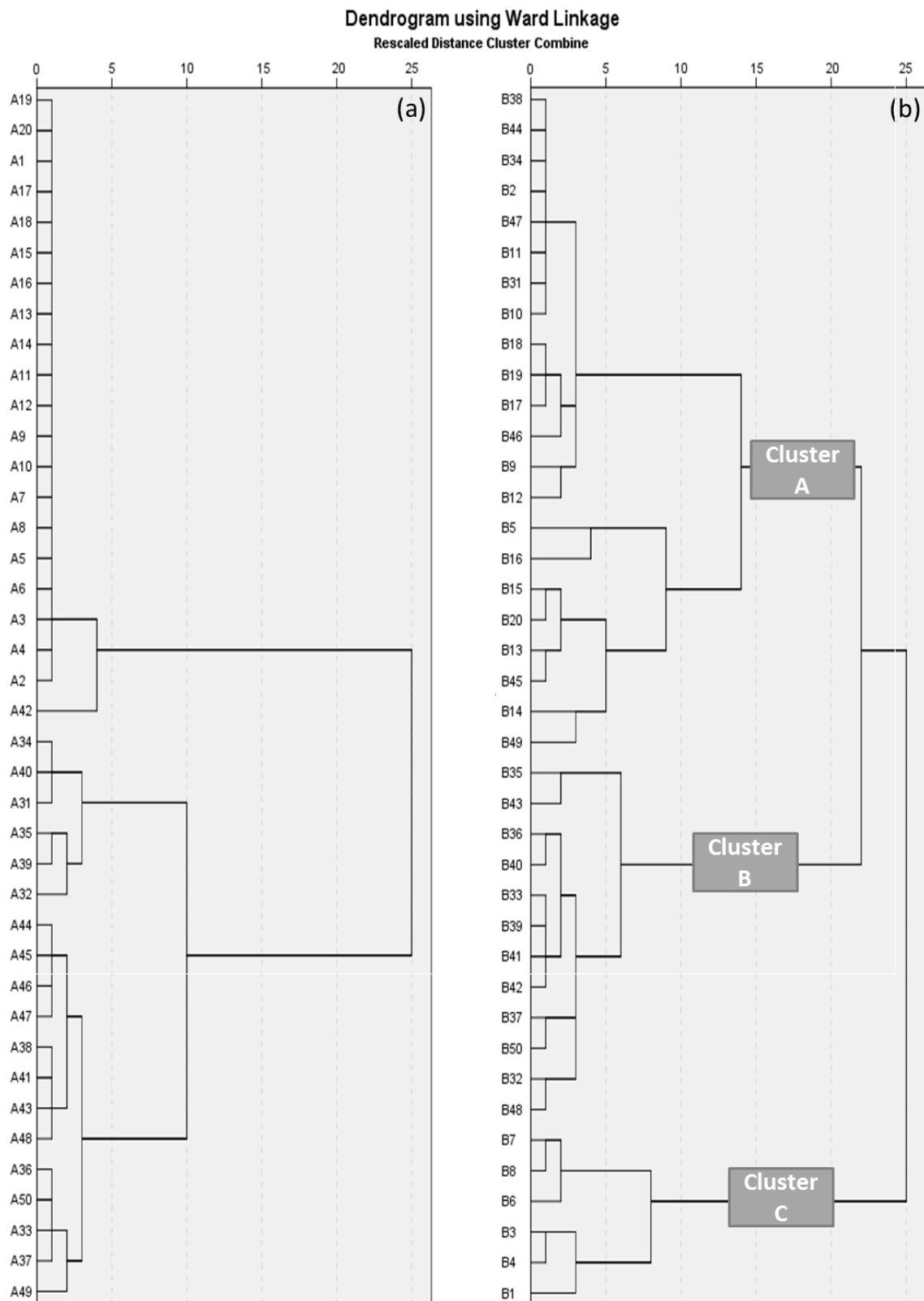


Figura 4.8: Dendrograma da análise de cluster obtido usando as concentrações dos tipos polínicos para os diferentes indivíduos em dois casos distintos: (a) cavidades nasais e (b) tecido subungueal.

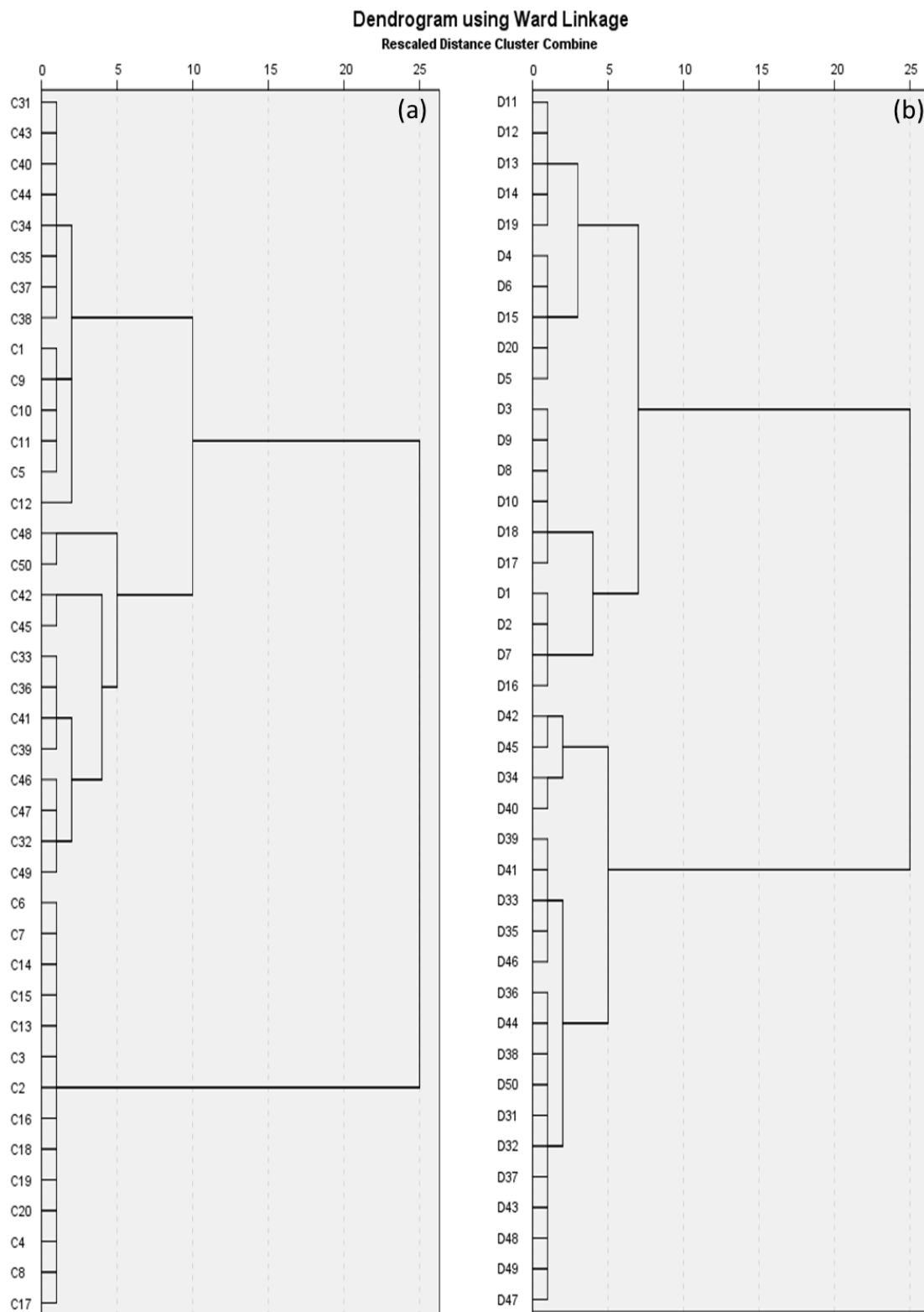


Figura 4.9: Dendrograma da análise de cluster obtido usando as concentrações dos tipos polínicos para os diferentes indivíduos em dois casos distintos: (a) solo e (b) cabelo.



No sentido de testar a capacidade da análise palinológica em amostras de solo como fator discriminador de locais, foi efectuada uma análise hierárquica de cluster em diferentes grupos de indivíduos que apresentavam como fator comum o local frequentado (4.10). À semelhança do observado na figura 4.9 (a) os indivíduos foram primeiramente separados com base no momento de amostragem, sendo que o cluster A e B agrupam os indivíduos amostrados no inverno (com exceção do indivíduo 48), enquanto que o cluster C agrupa indivíduos amostrados na primavera. Neste caso é possível observar que no cluster A apenas estão agrupados os indivíduos amostrados após a sua estadia durante três dias em Arcos de Valdevez, as distâncias entre os diferentes indivíduos é reduzida e uniforme, indicando que a diversidade polínica entre estes é reduzida. O mesmo acontece no cluster B, onde se encontram agrupados indivíduos amostrados que em simultâneo frequentaram o mesmo local antes da amostragem, e como tal não apresentam variabilidade entre si, traduzida pela forte correlação entre eles. Relativamente ao cluster C verificou-se o agrupamento de indivíduos pertencentes à mesma região (mesma aldeia), porém é observável uma maior variabilidade, que pode ser justificada pela existência de microfloras que conseguem ser discriminadas por análise palinológica, havendo uma forte correlação para os indivíduos que frequentam esses locais. Perante estes resultados é possível afirmar que, as amostras de diferentes regiões apresentam diferenças qualitativas e quantitativas, sendo que em determinadas situações, pequenas variações locais (raio de 2 km), essa diferença permite a discriminação entre amostras.

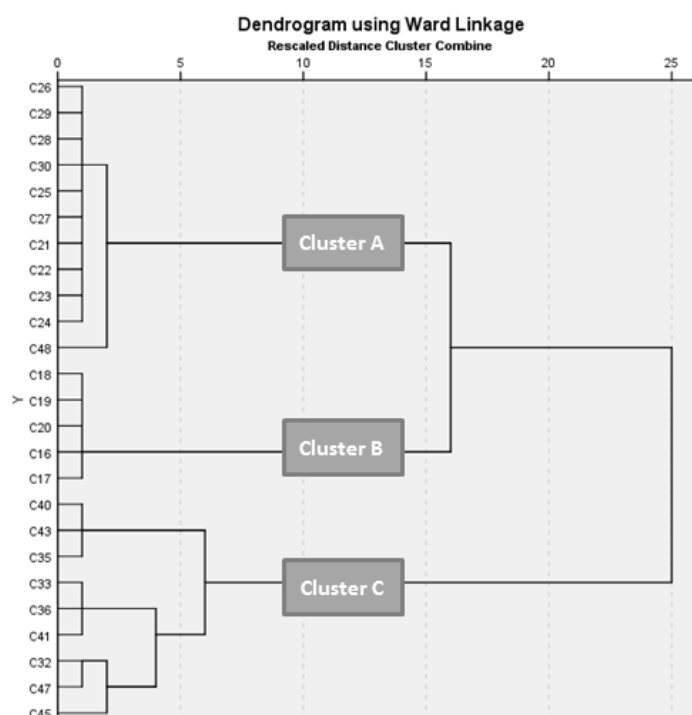


Figura 4.10: Dendrograma da análise de cluster obtido usando as concentrações dos tipos polínicos para diferentes indivíduos usando os valores de concentração (nº pólen/grama) de amostras de solo.

### 4.3 Pólen como Elemento de Identificação do Local e Enquadramento Temporal

Neste trabalho foi ainda avaliada a capacidade da análise palinológica na reconstituição de eventos, nomeadamente identificação temporal e espacial. Deste modo, foram amostrados 10 voluntários, após uma estadia no mesmo local durante três dias no início de Fevereiro (Arcos de Valdevez, Portugal).

Para estes indivíduos foi analisada a concentração total de pólen nas cavidades nasais, tecido subungueal, solo dos sapatos e cabelo, como pode ser observado na figura 4.11. Neste caso, é possível verificar uma concentração nula nas amostras das cavidades nasais, ocorrendo o aprisionamento de conteúdo polínico pelos restantes tipos de amostras. Tal como referido anteriormente, a ausência de pólen nas cavidades nasais pode dever-se à época do ano de amostragem coincidente com a reduzida concentração de pólen atmosférico. Relativamente aos restantes tecidos biológicos, o cabelo é o tecido com maior eficiência no aprisionamento de pólen, apresentando concentrações superiores quando comparado com as amostras de tecido subungueal. Em geral, o solo dos sapatos é o meio amostrado que apresenta a maior eficiência de aprisionamento polínico, sendo a sua concentração bastante superior à concentração observável para os tecidos biológicos.

Assim, os dados obtidos neste grupo de 10 voluntários, onde a amostragem foi temporal e geograficamente igual, corroboram os resultados observados previamente na amostragem efectuada ao longo do inverno e primavera em indivíduos provenientes de locais diferentes.

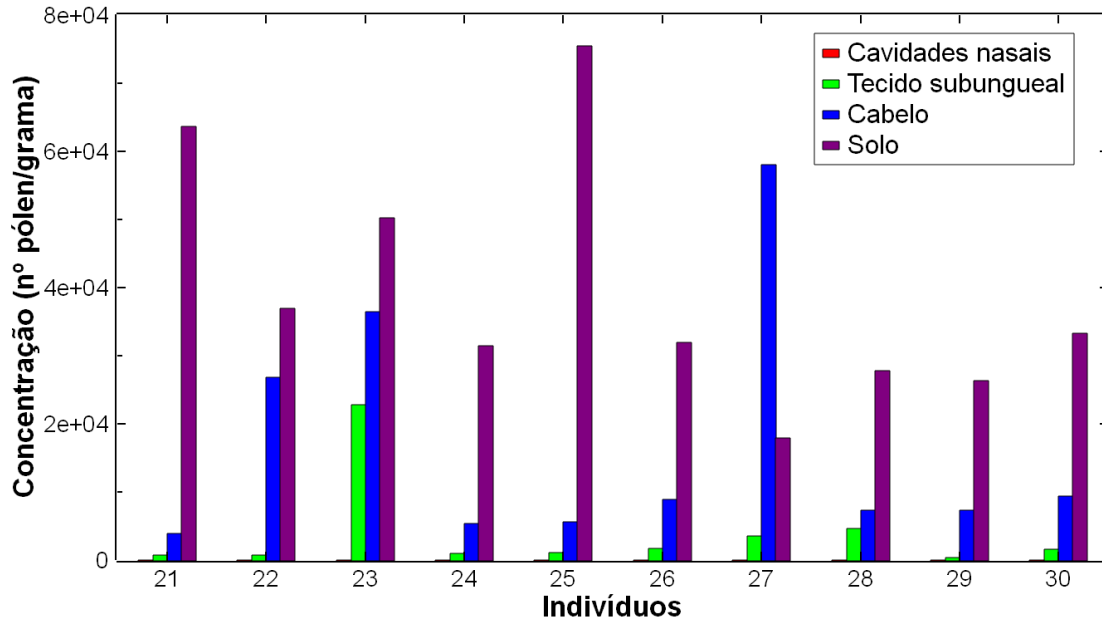


Figura 4.11: Concentração total de pólen (nº pólen/grama) em função dos indivíduos amostrados para: cavidades nasais, tecido subungueal, cabelo e solo.

Foi efetuada a comparação entre os tipos polínicos encontrados nas diferentes amostras dos 10 indivíduos, uma vez que estes foram expostos às mesmas condições temporais

e espaciais. Para isso foi calculada a frequência de cada tipo polínico em cada indivíduo, de forma a minimizar variáveis como a diferente eficiência de aprisionamento, tendo sido posteriormente calculada a média aritmética de cada um dos diferentes tipos polínicos encontrados. Foi ainda calculado o desvio padrão para cada tipo polínico, de forma a permitir a comparação entre os diferentes indivíduos. As amostras de cabelo e solo apresentam baixos valores de desvio padrão (figura 4.12); indicando a reduzida variabilidade entre os resultados dos diferentes indivíduos corroborando a mesma localização no mesmo período de tempo. Isto demonstra também que, em contexto forense, o perfil polínico poderá também ser utilizado para a associação de indivíduos a locais.

No entanto, no caso do tecido subungueal, o desvio padrão é mais elevado; provavelmente relacionado com o facto da quantidade de pólen encontrada neste tecido ser demasiado reduzida.

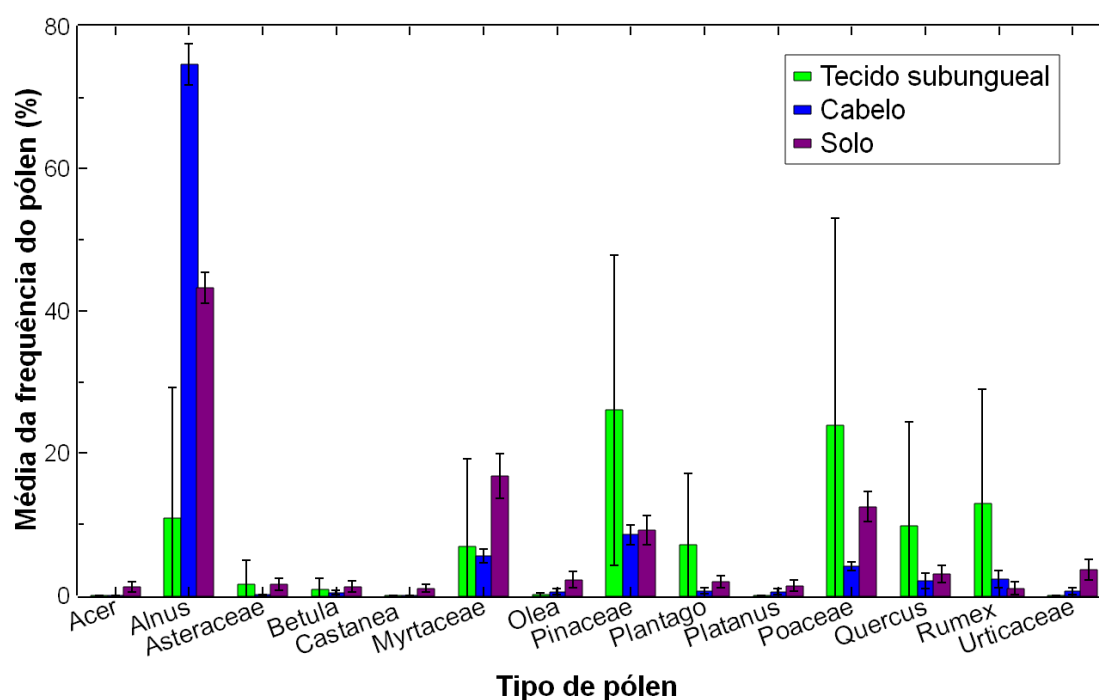


Figura 4.12: Média da frequência (%) dos diferentes tipos polínicos encontrados nas amostras de tecido subungueal, cabelo e solo. Foi também calculado o desvio padrão para cada tipo polínico representado pela barra de erro.

Nesta dissertação a análise palinológica foi também utilizada para a identificação de intervalos temporais. Assim utilizaram-se os tipos polínicos identificados nas amostras recolhidas na sola dos sapatos (figura 4.12) como referência da flora existente na área envolvente (mesmo aqueles cuja presença atmosférica era nula no momento de exposição).

É um facto que diferentes espécies apresentam diferentes tempos de floração, implicando que a libertação de grãos de pólen ocorra em diferentes momentos. Assim, através da presença e da ausência de determinados tipos polínicos em amostras aerobiológicas, é possível a elaboração de calendários polínicos de modo a permitir a identificação temporal da colheita das amostras. Assim, para verificar a possibilidade de localizar temporalmente

as amostras em estudo, foram observados os tipos polínicos mais abundantes presentes no cabelo, uma vez que o cabelo funciona como um captador de amostragem aerobiológica, indicando-nos assim o pólen existente no momento da exposição.

Nas amostras de cabelo e solo foram observados os seguintes tipos polínicos: *Alnus*, Myrtaceae, Pinaceae, Poaceae, *Quercus*, *Rumex* (abundantes no cabelo e solo) e *Acer* e *Castaneae* (presentes no solo e ausentes no cabelo).

Como é possível observar na figura 4.12 o tipo polínico dominante nas amostras de cabelo, com uma representatividade superior a 75% é o *Alnus*, espécie que apresenta um período de floração localizado em Fevereiro (a amostragem foi efetuada a 5 de Fevereiro), o que demonstra a possível utilidade desta técnica na localização temporal. Embora as amostras de solo de sapato apresentem maior diversidade polínica, a presença de pólen de *Alnus* foi elevada.

Os resultados da análise de cluster efetuada com os valores das concentrações de pólen presentes nos diferentes indivíduos (4.13) mostram a separação das amostras de tecido subungueal - cluster A - face às amostras de solo e cabelo, evidenciando assim a disseminação dos tipos polínicos e sua concentração face às amostras de solo e cabelo. Relativamente a estas últimas amostras, foi também possível a sua divisão em clusters distintos - cluster B (cabelo) e cluster C (solo).

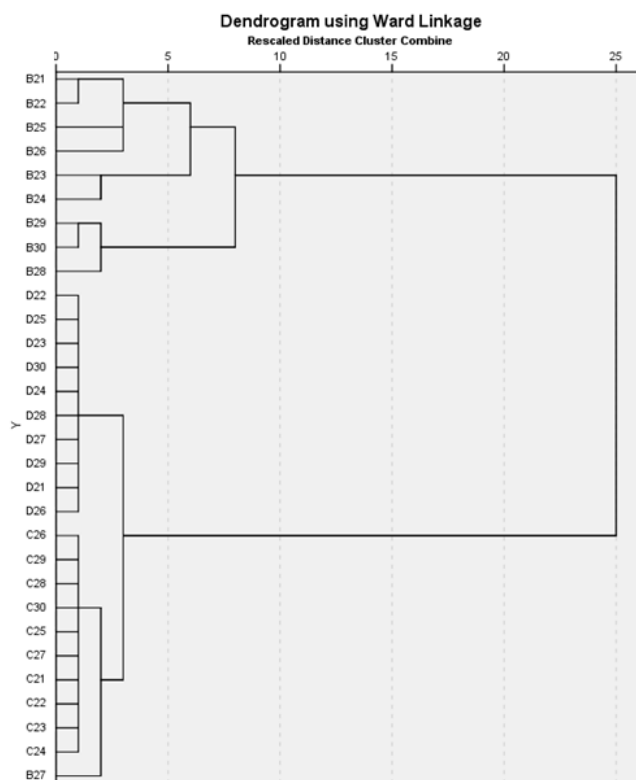


Figura 4.13: Dendrograma da análise de cluster obtido usando as concentrações dos diferentes indivíduos para os diferentes tipos de material amostrado (com exceção das amostras das cavidades nasais que não apresentavam conteúdo polínico).

No cluster A (tecido subungueal) foi ainda observada maior dissemelhança entre os indivíduos que o constituem comparativamente com o observado para os outros dois clusters, demonstrando a existência de maior diversidade polínica no tecido subungueal face aos restantes.

A maior semelhança entre indivíduos dentro do cluster B e C ainda indica a existência de uma baixa variabilidade polínica (qualitativa e quantitativa) entre os indivíduos, mas existindo uma variação entre as amostras provenientes do solo e cabelo. No caso do cluster C, é possível observar a presença de uma amostra de tecido subungueal (pertencente ao indivíduo 27), porém a correlação desta aos restantes indivíduos contidos pelo cluster é menor; a presença desta amostra neste cluster pode ser justificada pela reduzida representatividade das amostras deste tecido.

## Capítulo 5

# Conclusão

Nesta dissertação usou-se a palinologia como ferramenta forense para a avaliação da capacidade de tecidos biológicos e não biológicos funcionarem como armadilha natural de pólen. Para tal foram retiradas e analisadas amostras de cavidades nasais, tecido subungueal (tecido imediatamente sob as unhas), cabelo e solo de 40 indivíduos entre o inverno e a primavera. O solo presente no calçado, também, serviu como um meio importante de armazenamento do pólen representativo da flora envolvente. Foram ainda observadas amostras de um conjunto de 10 indivíduos que esteve exposto às mesmas condições durante um intervalo de 3 dias no sentido de estudar a utilidade da informação polínica como elemento de identificação do local e enquadramento temporal.

Neste trabalho verificou-se que os diferentes tipos de material amostrado funcionam como armadilha natural de pólen e que possuem eficiências distintas de aprisionamento. O solo retém maiores concentrações de pólen, seguido do tecido subungueal ou cabelo (dependendo se as amostragens foram efetuadas no inverno ou primavera, respetivamente) e cavidades nasais. Também, a concentração total de pólen aprisionada foi influenciada pela época do ano em que a amostragem foi realizada; como exemplo, as amostras das cavidades nasais apenas apresentam palinómorfs na época primaveril. Assim sendo, o conhecimento da eficiência de aprisionamento de cada tecido assim como da evolução da concentração polínica ao longo das estações do ano é fundamental no contexto forense, uma vez que permite o planeamento da amostragem evitando a realização de procedimentos sem acréscimo à investigação. É indispensável a existência de um calendário polínico regional para comparação temporal com o pólen encontrado nas amostras recolhidas.

Foi ainda possível observar que diferentes tecidos nos permitem retirar diferentes informações; nomeadamente, as cavidades nasais e cabelo aprisionam pólen atmosférico dando assim uma noção temporal, enquanto que as amostras de solo, devido à capacidade deste material funcionar como reservatório polínico, permitem avaliar a flora envolvente, sendo úteis na delimitação de possíveis locais. Na reconstituição temporal importa referir que a quantidade de pólen encontrada no cabelo é superior à encontrada para as amostras das cavidades nasais, tornando assim os dados deste tecido menos significativos e os resultados mais propícios a erros. Em situações de corpos enterrados, existe a contaminação do cabelo com solo; nestes casos a amostragem das cavidades nasais é importante no estabelecimento da época do ano em que ocorreu a morte, pois os resultados desta análise serão representativos do pólen aerobiológico no momento da última respiração.

Foi verificado que o comprimento do cabelo influencia a eficiência de captura de pólen; cabelos longos possuem uma menor eficiência quando comparado com cabelos curtos. Apresentamos uma hipótese baseada em cargas elétricas, de forma a considerar atração e/ou repulsão eletrostática, que justifique este comportamento. Do nosso trabalho pareceu-nos não haver influência do comprimento das unhas e do cabelo no peso da amostra.

As amostras de solo, podem ainda funcionar como elemento de comparação, sendo crucial em contexto forense a recolha de diversas amostras controlo para que estas possam vir a ser comparadas com as amostras forenses, permitindo assim estabelecer o grau de associação entre elas.

A capacidade do perfil polínico na confirmação de locais e intervalos temporais foi testada. Uma vez que foram demonstradas diferenças entre os diferentes tecidos, é possível afirmar que cada tecido é capaz de fornecer diferentes informações; o cabelo, uma vez que aprisiona o pólen aerobiológico, será mais influente na determinação de intervalos temporais, enquanto o solo, funcionando como reservatório polínico, terá um papel crucial na reconstituição da flora envolvente e consequente determinação e confirmação espacial. Neste caso, a determinação do intervalo temporal foi efetuada pela comparação de diferentes tipos polínicos presentes em amostras de cabelo e solo. Deste modo, é possível afirmar que para uma análise mais completa devem ser analisados em coletivo os resultados dos diferentes tecidos amostrados. Além disso, uma vez que o mesmo perfil polínico pode indicar uma localização, é possível, em contexto forense, o estabelecimento da presença de indivíduos no local; esta informação pode permitir associar um suspeito a uma vítima, e por conseguinte ao local onde ambos estiveram expostos.

O trabalho efetuado nesta dissertação demonstra a capacidade da palinologia em contexto forense. A colheita de amostras para análise palinológica são tecnicamente simples e rápidas (4 tecidos aproximadamente meia hora), podendo ser introduzidas sempre que se verificar necessário nas perícias forenses atuais. Futuramente, outros testes poderão ser realizados com base nos resultados fundamentados nesta dissertação, tais como:

- Medir e otimizar a eficiência do método de amostragem para as cavidades nasais;
- Estudar a variação da concentração total de pólen ao longo do período de um ano em tecidos biológicos;
- Estudar detalhadamente os processos que influenciam o aprisionamento de pólen aerobiológico no cabelo de forma a esclarecer o impacto da eletricidade estática no mesmo;
- Desenvolver e/ou utilizar métodos de tratamento/análise de amostras não destrutivos de forma a que, em contexto forense, a perda de evidência seja evitada;
- Aplicar o conhecimento obtido nesta dissertação em cadáveres no contexto forense;

# Bibliografia

- [1] R. O. Kapp, O. K. Davis and J. E. King, "Ronald O. Kapp's Pollen and Spores", American Association of Stratigraphic Palynologists Foundation, 2000.
- [2] K. Ritz, L. Dawson, and D. Miller, "Criminal and environmental soil forensics", Springer, 2009.
- [3] J. Jansonius and D. C. McGregor, "Palynology, principles and applications", American Association of Stratigraphic Palynologists Foundation, vol. 6, no. 2, 1996.
- [4] P. R. De Forest, R. E. Gaensslen and H. C. Lee, "Forensic Science: An Introduction to Criminalistics", McGraw-Hill, 1983.
- [5] E. Locard, "L'enquête criminelle et les méthodes scientifiques", E. Flammarion, 1920.
- [6] J. Horswell, "The Practice Of Crime Scene Investigation", CRC Press, 2016.
- [7] H. M. Coyle, "Forensic Botany: Principles and Applications to Criminal Casework" CRC Press, 2004.
- [8] E. Locard and D. J. Larson, "The analysis of dust traces. Part II", The American Journal of Police Science, vol.1, no. 4, 1930.
- [9] K. A. Walsh and M. Horrocks, "Palynology: its position in the field of forensic science", Journal of Forensic Sciences, vol. 53, no. 5, pp. 1053–1060, 2008.
- [10] A. G. Brown, "The use of forensic botany and geology in war crimes investigations in NE Bosnia", Forensic Science International, vol. 163, no. 3, pp. 204–210, 2006.
- [11] D. C. Mildenhall "Hypericum pollen determines the presence of burglars at the scene of a crime: an example of forensic palynology", Forensic Science International, vol. 163, no. 3, pp. 231–235, 2006.
- [12] G. Erdtman, "Handbook of Palynology: Morphology, Taxonomy, Ecology", Hafner Press, 1968.
- [13] M. Hesse, H. Halbritter, M Weber, et al., "Pollen Terminology: An illustrated handbook", Springer Vienna, 2009.



- [14] D. C. Mildenhall, "An unusual appearance of a common pollen type indicates the scene of the crime", *Forensic Science International*, vol. 163, no. 3, pp. 236–240, 2006.
- [15] B. Adams-Groom. "Forensic palynology", in J. Roberts and N. MarquezGrant, "Forensic ecology handbook: from crime scene to court", chapter 10, Wiley-Blackwell, 2012.
- [16] M. Anderson, "A closer look at plant reproduction, growth, and ecology. Britannica Educational Publishing, 2011.
- [17] R. G. Stanley and H. F. Linskens, "Pollen: biology, biochemistry, management", no. 1, Springer-Verlag, 1974.
- [18] K. R. Shivanna and N. S. Rangaswamy, "Pollen biology: a laboratory manual", Springer, 2012.
- [19] M. G. Simpson, "Plant Systematics", Academic Press, 2th edition, 2010.
- [20] G. Singh, "Plant systematics: an integrated approach", Science Publishers, 2004.
- [21] P. E. J. Wiltshire, "Consideration of some taphonomic variables of relevance to forensic palynological investigation in the United Kingdom", *Forensic Science International*, vol. 163, no. 3, pp.173–82, 2006.
- [22] K. Faegri and J. Iversen, "Textbook of pollen analysis", Blackwell Scientific Publishers, 4th edition, 1989.
- [23] V. M. Bryant and D. C. Mildenhall, "Forensic palynology: a new way to catch crooks", in V. M. Bryant and J. W. Wrenn, "New developements in palynomorphs sampling, extraction and analysis", American Association of Stratigraphic Palynologists Foundation, 1998.
- [24] R. P. Wodehouse, "Pollen grains: their structure, identification, and significance in science and medicine", McGraw-Hill, 1935.
- [25] G. Erdtman, "Pollen morphology and plant taxonomy: angiosperms", Brill Archive, 1986.
- [26] P. E. Wiltshire, D. L. Hawksworth, J. A. Webb, and K. J. Edwards, "Two sources and two kinds of trace evidence: enhancing the links between clothing, footwear and crime scene", *Forensic Science International*, vol. 254, pp. 231–242, 2015.
- [27] D. C. Mildenhall, "An example of the use of forensic palynology in assessing an alibi", *Journal of Forensic Sciences*, vol. 49, no. 2, pp. 312–316, 2004.

- [28] M. Horrocks and K. Walsh, "Fine resolution of pollen patterns in limited space: differentiating a crime scene and alibi scene seven meters apart", *Journal of Forensic Sciences*, vol. 44, no. 2, pp. 417-420, 1999.
- [29] H. M. Coyle, C. Ladd, T. Palmbach, and H. C. Lee, "The green revolution: botanical contributions to forensics and drug enforcement", *Croatian Medical Journal*, vol. 42, no. 3, pp. 340-345, 2001.
- [30] P. E. J. Wiltshire, D. L. Hawksworth, J. A. Webb, and K. J. Edwards, "Palynology and mycology provide separate classes of probative evidence from the same forensic samples: a rape case from southern England", *Forensic Science International*, vol. 244, pp. 186-95, 2014.
- [31] P. Arguelles, K. Reinhard, and D. H. Shin, "Forensic palynological analysis of intestinal contents of a Korean mummy" *The Anatomical Record*, vol. 298, no. 6, pp: 1182-1190, 2015.
- [32] A. M. Mercuri, "Applied palynology as a trans-disciplinary science: the contribution of aerobiology data to forensic and palaeoenvironmental issues", *Aerobiologia*, vol. 31, no. 3 pp. 323-339, 2015.
- [33] E. Montali, A. M. Mercuri, G. T. Grandi, and C. A. Accorsi, "Towards a "crime pollen calendar" - pollen analysis on corpses throughout one year", *Forensic Science International*, vol. 163, no. 3, pp. 211- 223, 2006.
- [34] P. E. J. Wiltshire and S. Black, "The cribriform approach to the retrieval of palynological evidence from the turbinates of murder victims", *Forensic Science International*, vol. 163, no. 3, pp. 224-230, 2006.
- [35] R. Szibor, C. Schubert, R. Schoning, D. Krause, and U. Wendt, "Pollen analysis reveals murder season", *Nature*, vol. 395, no. 6701, pp. 449-450, 1998.
- [36] P. E. Wiltshire, D. L. Hawksworth, and K. J. Edwards, "Light microscopy can reveal the consumption of a mixture of psychotropic plant and fungal material in suspicious death", *Journal of Forensic and Legal Medicine*, vol. 34, pp. 73-80, 2015.
- [37] P. E. J. Wiltshire, "Hair as a source of forensic evidence in murder investigations" *Forensic Science International*, vol. 163, no. 3, pp. 241-248, 2006.
- [38] A. Sandiford, "Palynology, Pollen, and Spores, Partners in Crime: What, why, and how" in D. W. Hall and J. H. Byrd, *Forensic botany: a pratical guide*, chapter 8, pages 127-144. Wiley-Blackwell, 2012.
- [39] M. Horrocks, S. Coulson, and K. Walsh, "Forensic palynology: variation in the pollen content of soil surface samples", *Journal of Forensic Sciences*, vol. 43, no. 2, pp.320-323, 1998.

- [40] J. B. Riding, B. G. Rawlins, and K. H. Coley, "Changes in soil pollen assemblages on footwear worn at different sites", *Palynology*, vol. 31, no. 1, pp. 135–151, 2007.
- [41] C. Schield, C. Campelli, J. Sycalik, et al., "Identification and persistence of pinus pollen DNA on cotton fabrics: a forensic application", *Science & Justice*, vol. 56, no. 1, pp. 29–34, 2016.
- [42] P. E. J. Wiltshire, "Protocols for forensic palynology", *Palynology*, vol. 40, no. 1, pp. 4–24, 2016.
- [43] M. S. Zavada, S. M. McGraw, and M. A. Miller, "The role of clothing fabrics as passive pollen collectors in the northeastern United States", *Grana*, vol. 46, no. 4, pp. 285–291, 2007.
- [44] P. E. J. Wiltshire, D. L. Hawksworth, and K. J. Edwards, "A rapid and efficient method for evaluation of suspect testimony: palynological scanning", *Journal of Forensic Sciences*, vol. 60, no. 6, pp. 1441–1450, 2015.
- [45] R. M. Morgan, J. Flynn, V. Sena, and P. A. Bull, "Experimental forensic studies of the preservation of pollen in vehicle fires", *Science & Justice*, vol. 54, no. 2, pp. 141–145, 2014.
- [46] R. M. Morgan, E. Allen, T. King, and P. A. Bull, "The spatial and temporal distribution of pollen in a room: forensic implications", *Science & Justice*, vol. 54, no. 1, pp. 49–56, 2014.
- [47] R. M. Morgan, G. Davies, F. Balestri, and P. A. Bull, "The recovery of pollen evidence from documents and its forensic implications", *Science & Justice*, vol. 53, no. 4, pp. 375–384, 2013.
- [48] K. L. Bell, K. S. Burgess, K. C. Okamoto, et al., "Review and future prospects for DNA barcoding methods in forensic palynology", *Forensic Science International: Genetics*, vol. 21, pp. 110–116, 2016.
- [49] M. Horrocks, "Sub-sampling and preparing forensic samples for pollen analysis", *Journal of Forensic Sciences*, vol. 49, no. 5, pp. 1024–1027, 2004.
- [50] K. N. Mertens, K. Verhoeven, T. Verleye, et al., "Determining the absolute abundance of dinoflagellate cysts in recent marine sediments: the *Lycopodium* marker-grain method put to the test", *Review of Palaeobotany and Palynology*, vol. 157, no. 3–4, pp. 238–252, 2009.
- [51] I. Abreu, H. Ribeiro, and M. Cunha, "An aeropalynological study of the Porto region (Portugal)", *Aerobiologia*, vol. 19, no. 3–4, pp. 235–241, 2003.

- [52]** I. C. Camacho, E. Caeiro, R. Ferro, et al., “Spatial and temporal variations in the Annual Pollen Index recorded by sites belonging to the Portuguese Aerobiology Network”, *Aerobiologia*, vol. 33, no. 2, pp: 265–279, 2017.
- [53]** H. Ribeiro and I. Abreu, “A 10-year survey of allergenic airborne pollen in the city of Porto (Portugal)”, *Aerobiologia*, vol. 30, no. 3, pp: 333–344, 2014.
- [54]** P. H. W. Vercoulen, R. A. Roos, J. C. M. Marijnissen and B. Scarlett, “Measuring electric charge on pollen”, *Journal of Aerosol Science*, vol. 23 pp: 377–380, 1992.
- [55]** G. E. Bowker and H. C. Crenshaw, “Electrostatic forces in wind-pollination— Part 1: Measurement of the electrostatic charge on pollen”, *Atmospheric Environment*, vol. 41, no. 8, pp:1587–1595, 2007.
- [56]** A. J. P. Martin, “Tribo-electricity in wool and hair”, *Proceedings of the Physical Society*, vol. 53, no. 2, pp.186, 1941.

# Anexo

## INFORMAÇÃO AO PARTICIPANTE

E

### DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM INVESTIGAÇÃO

de acordo com a Declaração de Helsínquia<sup>1</sup> e a Convenção de Oviedo<sup>2</sup>

*Por favor, leia com atenção a seguinte informação. Se achar que algo está incorreto ou que não está claro, não hesite em solicitar mais informações. Se concorda com a proposta que lhe foi feita, queira assinar este documento.*

**Título do estudo:** Análise palinológica forense em diferentes tecidos biológicos

**Enquadramento:** O presente estudo realiza-se no âmbito do Curso de Mestrado em Ciências Forenses realizado pelo Departamento de Medicina Legal e Ciências Forenses da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. O investigador principal é a Lic. Joana Soraia Rosas Pereira sob a orientação da Professora Doutora Ilda da Conceição Abreu de Noronha.

**Explicação do estudo:** O principal objetivo deste trabalho é verificar se o pólen e esporos de plantas permanecem aprisionados em diversos tecidos do corpo humano como é o caso do cabelo, tecido sobre as unhas (tecido subungueal), cavidades nasais e solo presente nas solas dos sapatos, e com base nos resultados obtidos verificar se o estudo dos grãos de pólen e esporos pode ter utilidade como meio de prova no contexto de investigação criminal. Caso se verifique a utilidade deste estudo na resolução de processos criminais, um outro objetivo será estabelecido que consiste na elaboração de um protocolo (guia) de colheita e tratamento destas amostras que possa ser aplicado no processo de investigação criminal sem que sejam necessárias adaptações considerativas nos procedimentos adotados atualmente.

O estudo destas estruturas (grãos de pólen e esporos de plantas) é designado por análise palinológica, mas quando este estudo é aplicado na resolução de processos criminais é designada de análise palinológica forense.

A colheita das amostras é realizada através de métodos não invasivos, seguidamente descritos:

i) Cabelo: lavagem com recurso a uma solução de detergente antimicrobiano diluído e quente. A solução é colocada no cabelo e este é seguidamente agitado e esfregado vigorosamente durante alguns minutos. Depois é feita a lavagem com água destilada.

ii) Nas cavidades nasais, o método mais expedito é a utilização de zaragatoas, que serão inseridas nas narinas e realizado o esfregaço. São efetuadas 4 zaragatoas (2 em cada narina).

iii) Tecido subungueal (das mãos): Raspagem e lavagem da superfície subungueal. A raspagem é realizada com uma espátula esterilizada e seguidamente realiza-se a lavagem com a solução de detergente antimicrobiano diluído e auxílio de uma escova.

iv) Solo dos sapatos: a amostragem é efetuada através da raspagem e lavagem do conteúdo presente na sola dos sapatos. A raspagem ocorre com recurso a espátulas plásticas devidamente esterilizadas, enquanto que a lavagem é feita com recurso a solução de detergente antimicrobiano diluído com ajuda de uma escova.

A colheita das amostras é agendada com o investigador de acordo com a disponibilidade do voluntários e todas as colheitas serão recolhidas num local da responsabilidade do investigador. Haverá apenas um momento de amostragem com cada voluntário.

<sup>1</sup> [http://portal.arsnorte.min-saude.pt/portal/page/portal/ARSNorte/Comiss%C3%A3o%20de%20C3%89tica/Ficheiros/Declaracao\\_Helsinki\\_2008.pdf](http://portal.arsnorte.min-saude.pt/portal/page/portal/ARSNorte/Comiss%C3%A3o%20de%20C3%89tica/Ficheiros/Declaracao_Helsinki_2008.pdf)

<sup>2</sup> <http://dre.pt/pdf1sdip/2001/01/002A00/00140036.pdf>

## Análise Palinológica Forense em Tecidos de Voluntários Humanos

Sendo a análise palinológica um tratamento destrutivo, as amostras serão conservadas apenas até à realização do tratamento laboratorial, que decorre no Laboratório de Palinologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Esta é uma doação altruísta de modo que não existe qualquer compensação para o dador. Não se garante que este estudo envolva quaisquer benefícios diretos para o participante. Não existem também quaisquer riscos para o participante, apenas é possível um desconforto durante a colheita.

O projeto foi avaliado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar São João e da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto tendo sido aprovado.

Os resultados obtidos pelo estudo das amostras serão utilizados na dissertação podendo ser publicados em literatura da área de estudo.

**Confidencialidade e anonimato:** Aquando a colheita todos os dados serão objeto de codificação alfanumérica. A codificação alfanumérica consiste na codificação com recurso ao alfabeto e numeração, sendo identificados os tecidos com recurso a letras e os voluntários identificados numeralmente assegurando assim a anonimização dos mesmos.

O participante tem a liberdade de abandonar o projeto em qualquer momento do mesmo.

Se tiver qualquer dúvida, em qualquer momento, mesmo após a colheita, sobre o estudo poderá contactar o investigador responsável pelo projeto.

Lic. Joana Soraia Rosas Pereira, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto;

Contacto telefónico: 91039268;

Email: joanasrpereira.93@gmail.com

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

*Declaro ter lido e compreendido este documento, bem como as informações verbais que me foram fornecidas pela/s pessoa/s que acima assina/m. foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar participar neste estudo sem qualquer tipo de consequências. Desta forma, aceito participar neste estudo e permito a utilização dos dados que de forma voluntária forneço, confiando em que apenas serão utilizados para esta investigação e nas garantias de confidencialidade e anonimato que me são dadas pelo/a investigador/a.*

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

SE NÃO FOR O PRÓPRIO A ASSINAR POR IDADE OU INCAPACIDADE  
(se o menor tiver discernimento deve também assinar em cima, se consentir)

NOME: \_\_\_\_\_

BI/CD Nº: \_\_\_\_\_ DATA OU VALIDADE: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

GRAU DE PARENTESCO OU TIPO DE REPRESENTAÇÃO: \_\_\_\_\_

ASSINATURA \_\_\_\_\_

ESTE DOCUMENTO É COMPOSTO DE 2 PÁGINA/S E FEITO EM DUPLICADO:  
UMA VIA PARA O/A INVESTIGADOR/A, OUTRA PARA A PESSOA QUE CONSENTE